

Analyse der Regulationsmechanismen des humanen Tumorsuppressor Gens *H-REV107-1*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Steffen Reich

geb. am 19. Januar 1971 in Genf, Schweiz

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Dr. habil. Christine Sers
 2. Prof. Dr. Hanspeter Herzel
 3. Prof. Dr. Wolfgang Uckert

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2006

Diese Arbeit widme ich

Frau Anke Reich,
deren Liebe und Geduld mich durch die schönen und schweren Stunden
dieser Promotionszeit begleitet haben.

"Let it be known
there is a fountain
that was not made
by the hands of men..."

Ripple (*Hunter, Garcia*), 1970, American Beauty, The Grateful Dead

ABBILDUNGSVERZEICHNISS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	XVI
LISTE DER ABKÜRZUNGEN	XIX
ZUSAMMENFASSUNG.....	XXI
ABSTRACT	XXII
 1 EINLEITUNG	 1
1.1 DIE TUMORENTSTEHUNG	1
1.1.1 <i>Onkogene</i>	1
1.1.2 <i>Tumorsuppressorgene</i>	2
1.1.2.1 Klasse I Tumorsuppressorgene	2
1.1.2.2 Klasse II Tumorsuppressorgene.....	3
1.1.2.3 Klasse II Tumorsuppressorgene im therapeutischen Ansatz.....	5
1.2 <i>H-REV107-1</i> IST EIN KLASSE II TUMORSUPPRESSORGEN.....	5
1.2.1 <i>Expression von H-REV107-1 in normalem Gewebe, in Tumoren sowie normalen und malignen Zelllinien</i> 5	
1.2.2 <i>H-rev107-1 besitzt wachstumshemmende Eigenschaften</i>	6
1.2.3 <i>H-REV107-1 liegt in humanen Tumoren als Wildtyp-Sequenz vor</i>	6
1.3 DIE H-REV107 FAMILIE	7
1.3.1 <i>Entdeckung und Funktion der Mitglieder der H-REV107 Gen-Familie</i>	7
1.3.2 <i>Die H-REV107 Familie ist Teil der NlpC/P60-Superfamilie</i>	7
1.3.2.1 Die P60-ähnliche Familie	8
1.3.2.2 Die Acmb-ähnliche Familie	8
1.3.2.3 Die YaeF-ähnliche Familie	8
1.3.2.4 Die LRAT-ähnliche Familie.....	9
1.4 DIE HUMANE H-REV107 PROTEINFAMILIE	9
1.5 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	11
 2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	 12
2.1 MATERIALIEN.....	12
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	12
2.1.2 <i>Kits</i>	12
2.1.3 <i>Geräte</i>	13
2.1.4 <i>Enzyme</i>	13
2.1.5 <i>Zelllinien</i>	14
2.1.6 <i>Bakterienstämme (Escherichia coli)</i>	14
2.1.7 <i>Antikörper für den Gel Retardations-Assay</i>	15

2.1.8	<i>Membranen</i>	15
2.1.9	<i>Oligonukleotide</i>	16
2.1.9.1	Primer für die Sequenzierung.....	16
2.1.9.2	Primer zur Synthese der Fragmente der SEAP Konstrukte	16
2.1.9.3	Primer zur Synthese der Fragmente der pGL3 Konstrukte.....	17
2.1.9.4	Primer für die Sondenherstellung.....	17
2.1.9.5	Primer für die zielgerichtete Mutagenese	18
2.1.9.6	Oligonukleotide für EMSA Experimente	19
2.1.10	<i>Plasmide, Konstrukte und Phagen</i>	20
2.1.11	<i>Software</i>	21
2.1.11.1	Promoteranalyse	21
2.1.11.2	Datenbanken.....	21
2.1.12	<i>Stammlösungen</i>	21
2.1.13	<i>Medien</i>	23
2.1.13.1	Zellkultur	23
2.1.13.2	Bakterienkultur	23
2.1.14	<i>Gel-Zusammensetzung</i>	25
2.2	METHODEN	26
2.2.1	<i>RNA-Isolierung aus Säuger-Zelllinien</i>	26
2.2.2	<i>DNA Isolierung</i>	26
2.2.2.1	Maxi Präparation	26
2.2.2.2	Mini Präparation.....	27
2.2.3	<i>Manipulation von DNA</i>	27
2.2.3.1	Verdau von DNA	27
2.2.3.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	27
2.2.3.3	Ligation von DNA Fragmenten	27
2.2.3.4	Einführung von Punkt-Mutationen.....	28
2.2.4	<i>5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden</i>	28
2.2.5	<i>Northern Blot Hybridisierung für mRNA</i>	29
2.2.6	<i>Southern Blot Hybridisierung für DNA</i>	29
2.2.7	<i>PCR</i>	30
2.2.7.1	Herstellung der humanen H-REV107-1 Sonde für den Northern- und Southern Blot Hybridisierungsassay	30
2.2.7.2	Herstellung der IRF-1 Sonde für den Northern Blot Hybridisierungsassay (human und Ratte)	31
2.2.7.3	Herstellung der Ratten H-rev107-1 Sonde für den Northern Blot Hybridisierungsassay.....	31
2.2.7.4	Herstellung der pGL3-Promoterkonstrukte	32
2.2.7.5	Herstellung der SEAP-Promoterkonstrukte.....	33
2.2.8	<i>Sequenzierung</i>	34
2.2.8.1	Genome Priming System.....	34
2.2.8.2	zyklische Sequenzierung	35
2.2.9	<i>Primer Extension</i>	35

2.2.9.1	Markieren des Primers.....	35
2.2.9.2	radioaktive Sequenzierung im Zuge des Primer Extension Nachweises	36
2.2.10	Bakterienkultur.....	37
2.2.10.1	allgemeine Bakterienkultur	37
2.2.10.2	Transformation	37
2.2.11	Zellkultur.....	38
2.2.11.1	allgemeine Zellkultur.....	38
2.2.11.2	Transiente Transfektion	38
2.2.12	Reporterassay.....	38
2.2.12.1	Great EscAPe™ SEAP Reporter Assay System (Clontech).....	38
2.2.12.2	Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)	39
2.2.13	Proteinisolierung aus Zellkernen	39
2.2.14	EMSA.....	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	AUFBAU DES HUMANEN <i>H-REV107-1</i> GENS	41
3.2	EXPRESSION VON <i>H-REV107-1</i> IN SÄUGETIER-ZELLINIEN.....	41
3.2.1	Die <i>H-REV107-1</i> Genexpression in unbehandelten Zelllinien	41
3.2.2	Abhängigkeit der <i>H-REV107-1</i> Genexpression von RAS-Signalwegen.....	43
3.2.3	Abhängigkeit der <i>H-REV107-1</i> Genexpression von der Methylierung CpG-reicher Regionen.....	45
3.3	<i>H-REV107-1</i> ALS ZIELGEN VON IFN- γ UND IRF-1	46
3.3.1	Expression von <i>H-REV107-1</i> nach der Applikation von IFN- γ	46
3.3.2	Induktion der <i>H-REV107-1</i> Expression mittels Östrogen-induzierbarer Aktivität von Irf-1	49
3.3.3	Korrelation der <i>H-REV107-1</i> und der IRF-1 Genexpression in humanen Zelllinien	51
3.3.4	Zeitabhängige Korrelation der Genexpression von <i>H-REV107-1</i> und IRF-1.....	53
3.3.5	<i>H-REV107-1</i> als Zielgen des MAPK- und des STAT-Signalwegs	55
3.4	KLONIERUNG DES <i>H-REV107-1</i> PROMOTERS.....	60
3.4.1	Identifizierung relevanter genomischer Bereiche aus einer Genbank.....	60
3.4.2	Klonierung der <i>H-REV107-1</i> positiven DNA Fragmente in den Vektor Bluescript II KS+ (Stratagene).....	63
3.4.3	Vergleich der Restriktionsprodukte des Phagen P1-8 mit den Restriktionsprodukten genomischer Gesamt-DNA	64
3.5	BESTIMMUNG REGULATORISCHER BEREICHE IM <i>H-REV107-1</i> PROMOTER	66
3.5.1	<i>in silico</i> Bestimmung der Promotersequenz.....	66
3.5.2	Analyse der Transkriptionsstartpunkte.....	68
3.5.3	Bestimmung von <i>H-REV107-1</i> Core Promoter Elementen	70
3.5.4	<i>in silico</i> Analyse der Transkriptionsfaktorenbindungsstellen	73
3.6	ANALYSE DES <i>H-REV107-1</i> PROMOTERS MITTELS REPORTER ASSAY	75
3.6.1	Klonierung des <i>H-REV107-1</i> Promoters in den SEAP Reportersystem-Vektor.....	75
3.6.2	SEAP Reporter Assay	77
3.7	ANALYSE DES <i>H-REV107-1</i> PROMOTERS IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER SYSTEM PGL3	80

3.7.1	Klonierung des H-REV107-1 Promoters in den Dualen Luciferase Vektor pGL3.....	80
3.7.2	Die Aktivität verkürzter H-REV107-1 Promoterkonstrukte	82
3.7.3	Die Aktivität der H-REV107-1 Promoterkonstrukte nach Stimulation mit IFN- γ , TNF- α , cAMP und Nogalamycin	88
3.7.4	Die Aktivität der H-REV107-1 Promoterkonstrukte nach Mutation einzelner Transkriptionsfaktorbindungsstellen	91
3.7.5	Die Aktivität der H-REV107-1 Promoterkonstrukte in Abhängigkeit vom NF κ B-Signalweg.....	96
3.7.6	Methylierung von A-3.....	99
3.8	ANALYSE DER PROMOTERBINDENDEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	101
3.8.1	Analyse der potentiellen cRel-Bindungsstelle	102
3.8.2	Nachweis der Spezifität der Protein-Oligonukleotid Bindung durch Konkurrenz mit unmarkierten Oligonukleotiden und durch den Einsatz mutierter Oligonukleotide	104
3.8.3	Analyse der potentiellen CREB-Bindungsstelle.....	105
3.8.4	Nachweis der Spezifität der Protein-Oligonukleotid Bindung durch Konkurrenz mit unmarkierten Oligonukleotiden sowie durch den Einsatz mutierter Oligonukleotide	106
3.8.5	Identifizierung in vitro bindender Proteine mit Hilfe von Antikörpern.....	110
3.8.5.1	Identifizierung der die cRel Bindungsstelle bindenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern der NF κ B Familie.....	111
3.8.5.2	Identifizierung der die CREB-Bindungsstelle bindenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern der CREB-Familie.....	112
3.9	ABSCHLIEßENDE IN SILICO ANALYSE DES H-REV107-1 PROMOTERS.....	119
3.9.1	Der DNA-Bereich 5' der untersuchten Promotersequenz	119
3.9.2	Der DNA-Bereich 3' des Transkriptionsstartpunkts.....	121
3.9.3	Unterschiede der H-REV107-1 Promotoren von Ratte, Maus und Mensch.....	122
4	DISKUSSION	125
4.1	BINDUNGSSTELLEN-UNABHÄNGIGE PROMOTERSTUDIEN	125
4.1.1	Der Core-Promoter des humanen H-REV107-1 Gens.....	125
4.1.2	Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts	126
4.2	DIE SIGNALWEG-ABHÄNGIGE REGULATION VON H-REV107-1	126
4.2.1	Die Suppression der H-rev107-1 Expression über den MEK/ERK-Signalweg.....	126
4.2.2	Die Induktion der H-REV107-1 Expression über IFN- γ induzierte Signalwege und durch IRF-1	127
4.2.3	Die Wechselwirkung zwischen den über MEK verlaufenden und den von IFN- γ induzierten Signalwegen	131
4.2.4	Die Induktion der H-REV107-1 Expression über den TNF- α induzierten Signalweg	133
4.2.5	Die Wechselwirkungen zwischen dem TNF- α und dem IFN- γ induzierten Signalweg	135
4.2.6	Die Induktion der H-REV107-1 Expression durch den cAMP-abhängigen Signalweg und den Faktor ATF-2.....	136
4.2.7	Ein Modell der H-REV107-1 Regulation.....	137
4.2.8	Die H-REV107-1 Expression in der Antwort der Zelle auf eine Vireninfection.....	140

4.2.9	<i>Die Methylierung des Promoters sowie die mögliche Bedeutung der GC-Box.....</i>	<i>140</i>
4.3	AUSBLICK	141
REFERENZEN		I

Abbildungsverzeichniss

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZIRKULÄREN PERMUTATION KONSERVIERTER AMINOSÄUREN IN DER YAEF- UND LRAT-ÄHNLICHEN FAMILIE.....	9
ABBILDUNG 2: DER VERGLEICH DER PROTEINSEQUENZEN DER MITGLIEDER DER H-REV107-FAMILIE. DIE FETTGEDRUCKTEN BUCHSTABEN ZEIGEN DIE IN ALLEN FAMILIENMITGLIEDERN KONSERVIERTEN AMINOSÄUREN. DIE GRAU HINTERLEGTE BEREICHE ZEIGEN POTENTIELLE DOMÄNEN. DIE DOMÄNEN SIND MIT IHREM JEWEILIGEN NAMEN ÜBERSCHRIEBEN (NAZARENKO ET AL., 2004).	11
ABBILDUNG 3: AUFBAU DES HUMANEN <i>H-REV107-1</i> GENS. DIE VIER EXONS SIND ÜBER EINE LÄNGE VON 39700 BASENPAAREN AUF CHROMOSOM 11Q12.3 LOKALISIERT. ATG BEZEICHNET DEN TRANSLATIONSSTARTPUNKT. DIE ANALYSE WURDE MIT HILFE DER DATENBANK „HIGH THROUGHPUT GENOME SEQUENCING“ VON NCBI DURCHGEFÜHRT. URL: HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/BLAST/	41
ABBILDUNG 4: A) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER RATTEN OVARIALEPITHELZELLINIE ROSE199 UND DER KRAS-TRANSFORMIERTEN RATTEN OVARIALKARZINOMZELLINIE ROSE199A2/5. DER PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> SPEZIFISCHE mRNA. B) PHOTO DES MIT ETHIDIUMBROMID GEFÄRBTEN GELS ALS LADEKONTROLLE.	42
ABBILDUNG 5: A) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER IMMORTALISIERTEN OVARIALEPITHELZELLINIE HOSE UND DEN OVARIALKARZINOMZELLINIEN SKOV-3, OVCAR-3 UND A27/80. DER GESCHLOSSENE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE BANDE. DER OFFENE PFEIL ZEIGT DIE BANDE DES NICHT NÄHER SPEZIFIZIERTEN GENS. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE. B) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER IMMORTALISIERTEN OVARIALEPITHELZELLINIE HOSE, DEN OVARIALKARZINOMZELLINIEN SKOV-3, OVCAR-3 UND A27/80 SOWIE DER TERATOKARZINOMZELLINIE PA-1. DER OBERE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE BANDE. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.	43
ABBILDUNG 6: A) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER RATTEN OVARIALEPITHELZELLINIE ROSE199 UND DER KRAS-TRANSFORMIERTEN RATTEN OVARIALKARZINOMZELLINIE ROSE199A2/5. ROSE199A2/5 WIRD 48 H MIT DEM MEK1 INHIBITOR PD98059 (50 µG/ML), UND 48 H MIT DEM PI3K INHIBITOR LY294002 (10 µG/ML) BEHANDELT. DER OBERE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE BANDE. DER UNTERE PFEIL ZEIGT, ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG, DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE. B) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER HUMANEN TERATOKARZINOMZELLINIE PA-1. DIE ZELLINIE WIRD 48 H MIT DEM MEK1 INHIBITOR PD98059 (50 µG/ML) UND 48 H MIT DEM PI3K INHIBITOR LY294002 (10 µG/ML) BEHANDELT. DER OBERE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE BANDE. DER UNTERE PFEIL ZEIGT, ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG, DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.	44
ABBILDUNG 7: DIE OBERE ABBILDUNG ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> EXPRESSION IN EINEM NORTHERN BLOT HYBRIDISIERUNGSASSAY. DIE UNTERE ABBILDUNG ZEIGT DAS MIT ETHIDIUMBROMID ANGEFÄRBT GEL ALS LADUNGSKONTROLLE. DIE ERSTEN VIER SPUREN ZEIGEN DAS ERGEBNIS FÜR DIE ZELLINIE OVCAR-3, DIE NÄCHSTEN VIER SPUREN FÜR DIE ZELLINIE A27/80, DIE FOLGENDEN VIER SPUREN FÜR DIE ZELLINIE OAW UND DIE LETZTEN VIER SPUREN FÜR DIE ZELLINIE SKOV-3. DIE RNA WIRD AUS UNBEHANDELTEN, AUS NUR	

MIT IFN- γ BEHANDELTEN (48 STUNDEN, 100 U/ML), AUS NUR MIT 5-AZA-2'-DESOXYCYTIDIN (48 STUNDEN, 1 μ MOL) ODER AUS MIT IFN- γ (48 STUNDEN, 100 U/ML) UND 5-AZA-2'-DESOXYCYTIDINE (48 STUNDEN, 1 μ MOL) BEHANDELTEN ZELLEN ISOLIERT (SIEHE + / - IN DER LEGENDE). IM FALLE DER BEHANDLUNG MIT 5-AZA-2'-DESOXYCYTIDIN WIRD DAS MEDIUM NACH 24 STUNDEN GEWECHSELT. DER OBERE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE BANDE.	45	
ABBILDUNG 8: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER RATTEN OVARIALEPITHELZELLINIE ROSE199 UND DER KRAS-TRANSFORMIERTEN RATTEN OVARIALKARZINOMZELLINIE ROSE199A2/5. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT ODER WURDEN FÜR 48 STUNDEN MIT 500 U/ML ODER 1000 U/ML IFN- γ BEHANDELT. DER PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.		47
ABBILDUNG 9: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES STAT-SIGNALWEGS. DAS STAT-1 HOMODIMER BINDET IM ZELLKERN AN DIE GAS-BINDUNGSSTELLE EINES PROMOTERS UND AKTIVIERT DIE EXPRESSION DES ZUGEHÖRIGEN GENS (RAMANA ET AL., 2002).		48
ABBILDUNG 10: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND DER <i>IRF-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER RATTEN OVARIALEPITHELZELLINIE ROSE199 UND DER KRAS-TRANSFORMIERTEN RATTEN OVARIALKARZINOMZELLINIE ROSE199A2/5. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT ODER 48 H MIT 500 U ODER 1000 U IFN- γ /ML BEHANDELT. DIE BEIDEN OBEREN PFEILE ZEIGEN DIE <i>H-REV107-1</i> UND DIE <i>IRF-1</i> SPEZIFISCHE mRNA. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER UNTERE PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.		49
ABBILDUNG 11: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER ZELLINIE KA-1. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT BZW. FÜR 48 STUNDEN MIT ÖSTROGEN (1 μ MOL) ODER MIT ÖSTROGEN (1 μ MOL) UND CYCLOHEXIMID (50 μ MOL) BEHANDELT. DER PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.		50
ABBILDUNG 12: NORTHERN BLOT ANALYSE VON <i>H-REV107-1</i> UND <i>IRF-1</i> IN DER IMMORTALISIERTEN OVARIALEPITHELZELLINIE HOSE, DEN OVARIALKARZINOMZELLINIEN SKOV-3, OVCAR-3 UND A27/80 SOWIE DER TERATOKARZINOMZELLINIE PA-1. DIE BEIDEN OBEREN PFEILE ZEIGEN DIE <i>H-REV107-1</i> - UND DIE <i>IRF-1</i> -SPEZIFISCHE BANDE. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER UNTERE PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE. ...		51
ABBILDUNG 13: A) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND <i>IRF-1</i> mRNA EXPRESSION IN DEN OVARIALKARZINOMZELLINIEN OVCAR-3 UND A27/80. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT BZW. 48H MIT 500 U ODER 1000 U IFN- γ /ML BEHANDELT. DIE BEIDEN OBEREN PFEILE ZEIGEN DIE <i>H-REV107-1</i> - UND DIE <i>IRF-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. DER UNTERE PFEIL ZEIGT, ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG, DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE. B) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND <i>IRF-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER OVARIALKARZINOMZELLINIE SKOV-3. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT BZW. 48H MIT 500 U ODER 1000 U IFN- γ /ML BEHANDELT. DIE BEIDEN OBEREN PFEILE ZEIGEN DIE <i>H-REV107-1</i> - UND DIE <i>IRF-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. DER UNTERE PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE. C) NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND <i>IRF-1</i> mRNA EXPRESSION IN DEN NIERENKARZINOMZELLINIEN RCC26 ENDO UND RCC26 EXO. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT BZW. 48H MIT 500 U ODER 1000 U IFN- γ PRO ML		

KULTURMEDIUM BEHANDELT. DIE BEIDEN OBEREN PFEILE ZEIGEN DIE <i>H-REV107-1</i> - UND DIE <i>IRF-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. DER UNTERE PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.....	53
ABBILDUNG 14: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND <i>IRF-1</i> mRNA EXPRESSION ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN IN DER HUMANEN OVARIALKARZINOMZELLINIE A27/80. DIE ZELLEN SIND ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 24 STUNDEN (100 U/ML) BZW. 96 STUNDEN (1000 U/ML) MIT 100 U/ML ODER 1000 U/ML IFN- γ PRO ML KULTURMEDIUM BEHANDELT. DER OBERE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE, DER MITTLERE PFEIL DIE <i>IRF-1</i> -SPEZIFISCHE UND DER UNTERE PFEIL DIE 28S-SPEZIFISCHE mRNA.	54
ABBILDUNG 15: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND <i>IRF-1</i> mRNA EXPRESSION ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN IN DER HUMANEN OVARIALKARZINOMZELLINIE OVCAR-3. DIE ZELLEN SIND ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 24 STUNDEN (100 U) BZW. 96 STUNDEN (1000 U) MIT 100 U ODER 1000 U IFN- γ PRO ML KULTURMEDIUM BEHANDELT WORDEN. DER OBERE PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE, DER MITTLERE PFEIL DIE <i>IRF-1</i> -SPEZIFISCHE UND DER UNTERE PFEIL DIE 28S-SPEZIFISCHE mRNA.	55
ABBILDUNG 16: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> UND DER <i>Irf-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER RATTEN OVARIALEPITHELZELLINIE ROSE199 UND DER KRAS-TRANSFORMIERTEN RATTEN OVARIALKARZINOMZELLINIE ROSE199A2/5. ROSE199 UND ROSE199A2/5 WIRD 48H MIT DEM MEK INHIBITOR PD98059 (50 μ G/ML) UND 48H MIT DEM PI3K INHIBITOR LY294002 (10 μ G/ML) BEHANDELT. DIE OBEREN PFEILE ZEIGEN DIE <i>H-REV107-1</i> UND DIE <i>Irf-1</i> SPEZIFISCHE BANDE. ANSCHLIEßEND WIRD DER SELBE BLOT ZUR KONTROLLE DER RNA-BELADUNG MIT EINER 28S SONDE HYBRIDISIERT. DER UNTERE PFEIL ZEIGT DIE 28S-SPEZIFISCHE BANDE.....	57
ABBILDUNG 17: OBEN: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER KRAS-TRANSFORMIERTEN RATTEN OVARIALKARZINOMZELLINIE ROSE199A2/5. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT, 48 STUNDEN MIT 500 U ODER 1000U/ML IFN- γ , 48 STUNDEN MIT 50 μ MOL PD98059 ODER 48 STUNDEN GLEICHZEITIG MIT 50 μ MOL PD98059 UND 1000U/ML IFN- γ BEHANDELT WORDEN. DER PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. UNTEN: PHOTO DES MIT ETHIDIUMBROMID GEFÄRBTEN GELS ALS LADEKONTROLLE.....	57
ABBILDUNG 18: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER HUMANEN OVARIALKARZINOMZELLINIE A27/80. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT, 48 STUNDEN MIT 500 U/ML ODER 1000U/ML IFN- γ BEHANDELT ODER 48 STUNDEN MIT 50 μ MOL PD98059 BZW. GLEICHZEITIG MIT 50 μ MOL PD98059 UND 1000U/ML IFN- γ BEHANDELT. DER PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. ALS LADUNGSKONTROLLE DIENT DAS PHOTO DES MIT ETHIDIUMBROMID GEFÄRBTEN GELS.	58
ABBILDUNG 19: NORTHERN BLOT ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> mRNA EXPRESSION IN DER HUMANEN NIERENKARZINOMZELLINIE MZ1257. DIE ZELLEN SIND UNBEHANDELT ODER 48 STUNDEN MIT 1000 U IFN- α , 1000 U IFN- γ BZW. 500 U TNF- α PRO ML BEHANDELT. DER PFEIL ZEIGT DIE <i>H-REV107-1</i> -SPEZIFISCHE mRNA. ALS LADUNGSKONTROLLE DIENT DIE NORTHERN BLOT ANALYSE DES SELBEN BLOTS MIT EINER GAPDH SONDE.	59
ABBILDUNG 20: CDNA SEQUENZ DES <i>H-REV107-1</i> GENS. DIE PRIMER, DIE ZUR HERSTELLUNG DER SPEZIFISCHEN SONDE VERWENDET WURDEN, SIND IN FETTEN BUCHSTABEN DARGESTELLT.....	60
ABBILDUNG 21: SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNG MIT DER, AUS DEN PHAGEN 1-3, 1-8, 1-10 UND 1-12, ISOLIERTEN PHAGEN-DNA, DIE VOR DER HYBRIDISIERUNG MIT DEN ANGEgebenEN ENZYMEN GESCHNITTEN WURDE. ALS SONDE WIRD EIN 387 BP GROßES FRAGMENT DER <i>H-REV107-1</i> CDNA BENUTZT (ABB. 20). DIE	

PFEILE ZEIGEN DIE STARK POSITIVEN DNA-FRAGMENTE, DIE IN EINER GRÖßENORDNUNG VON 7 KB (UNTERE PFEILE) BIS MEHR ALS 15 KB (OBERE PFEILE) LIEGEN.	61
ABBILDUNG 22: SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNG MIT DER AUS DEM PHAGEN 1-8 ISOLIERTEN DNA, DIE VOR DER HYBRIDISIERUNG MIT DEN ANGEGEBENEN ENZYMEN GESCHNITTEN WURDE. ALS SONDE WIRD EIN TEIL DER <i>H-REV107-1</i> cDNA BENUTZT. DIE PFEILE ZEIGEN DIE STARK POSITIVEN DNA-FRAGMENTE.....	62
ABBILDUNG 23: IN EINEM SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNGSASSAY WIRD MIT HILFE DER H-REV107-1 SONDE ÜBERPRÜFT, OB DIE ZUVOR AUS DEM „LOW-MELTING“ AGAROSE GEL ISOLIERTE DNA-BANDE DAS <i>H-REV107-1</i> GEN ENTHÄLT. DER LINKE PFEIL ZEIGT DAS STARK POSITIVE SIGNAL DES ZUVOR AUS DEM PHAGEN P1-8 ISOLIERTEN, CA. 5.5 KB GROßEN DNA-FRAGMENTS. DER RECHTE PFEIL ZEIGT IM VERGLEICH DAZU DIE 3.7 KB GROßE DNA-BANDE DES LINEARISIERTEN BLUESCRIPT II KS+ VEKTORS, DIE EBENFALLS EIN POSITIVES SIGNAL ZEIGT.	63
ABBILDUNG 24: IN EINEM SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNGSASSAY WERDEN DIE BLUESCRIPT KS+ PLASMIDE, DIE EIN SUBKLONIERTES <i>H-REV107-1</i> FRAGMENT ENTHALTEN, NACH VERDAU MIT <i>ECORI</i> , MIT DER H-REV107-1 SONDE HYBRIDISIERT. DER LINKE PFEIL ZEIGT DIE ZUM VERGLEICH AUFGETRAGENE, 5.5 KB GROßE AUSGANGS-DNA. 1-7 SIND POSITIVE, MIT <i>ECORI</i> VERDAUTE BLUESCRIPT KLONE.....	64
ABBILDUNG 25: IN EINEM SOUTHERN BLOT HYBRIDISIERUNGSASSAY WERDEN DIE, MIT JE EINEM RESTRIKTIONSENZYM GESCHNITTENEN, VERSCHIEDENEN PROBEN HUMANER GESAMT-DNA UND DIE DNA DES PHAGEN P1-8 MIT DER H-REV107-1 SONDE HYBRIDISIERT. DIE PFEILE ZEIGEN DIE, JEWEILS GLEICH GROßEN, POSITIVEN SIGNALE DER VERSCHIEDENEN PROBEN.	65
ABBILDUNG 26: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG POTENTIELLER H-REV107-1 PROMOTERBEREICHE UND TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTE NACH <i>IN SILICO</i> ANALYSE VON VERSCHIEDENEN PROMOTERANALYSE – PROGRAMMEN VORGESCHLAGENE, POTENTIELLE PROMOTERBEREICHE UND TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTE (TSP), SOWIE DIE IN DER NCBI DATENBANK "ALU" IDENTIFIZIERTE ALU-SEQUENZ. PFEILE: 1) FIRSTEF (PROMOTERBEREICH), 2) CONPRO (PROMOTERSTARTPUNKT), 3) PROMOTERINSPECTOR (PROMOTERBEREICH), 4) CONPRO (TSP), 5) MCPROMOTER (TSP-BEREICH), 6) DATABASETSS (TSP), (7) 12-1 cDNA (TSP). FETT GEDRUCKT: BP -716 BIS -999 (ALU-SEQUENZ).	68
ABBILDUNG 27: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VERSCHIEDENER, EXPERIMENTELL BESTIMMTER, TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTE DES <i>H-REV107-1</i> GENS. 9-1, 3-1 UND 12-1 ZEIGEN DIE STARTPUNKTE DER cDNA-KLONE, DIE NUMMERN 1–6 DIE ERGEBNISSE DER PRIMER EXTENSION UND DBTSS DEN STARTPUNKT DES LÄNGSTEN KLONS AUS DER DBTSS-DATENBANK.....	69
ABBILDUNG 28: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG POTENTIELLER CORE PROMOTER ELEMENTE FÜR DIE TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTE DBTSS UND 12-1. DIE NUMMERIERUNG BEZIEHT SICH IN DIESER ABBILDUNG AUF DIE JEWEILIGE BASE A DES TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKTS. DIE BASE 5' DER STARTBASE ERHÄLT DIE BEZEICHNUNG -1. CREB (BINDUNGSSTELLE FÜR EINEN FAKTOR DER CREB-FAMILIE), BRE (TFIIB RECOGNITION ELEMENT), INR (INITIATOR ELEMENT, BEINHÄLTET DAS CAP-SIGNAL CA [-1,+1]), CT-SIGNAL, DPE (DOWNSTREAM PROMOTER ELEMENT) UND MED-1 (MULTIPLE START SITE ELEMENT DOWNSTREAM)	72
ABBILDUNG 29: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REGULATORISCHEN REGION DES H-REV107-1 GENS MIT POTENTIELLEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN. DER TRANSLATIONSSTARTPUNKT IST MIT A ⁺¹ TG GEKENNZEICHNET. OBERHALB DES PRIMERS A BEFINDET SICH DER NICHT AMPLIFIZIERBARE BEREICH. DIE JEWEILIGEN PRIMER SIND MIT PFEILEN GEKENNZEICHNET. DIE POTENTIELLEN	

TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN SIND UNTERSTRICHEN. DIE BINDUNGSSTELLE FÜR STAT-1 ÜBERLAPPT MIT DEN BINDUNGSSTELLEN cREL #1 UND cREL #2 UND IST MIT EINER GESTRICHELTEN LINIE GEKENNZEICHNET. DER GESTRICHELTE PFEIL MAX. TSP ZEIGT DEN TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKT DER LÄNGSTEN <i>H-REV107-1</i> CDNA (DBTSS).....	76
ABBILDUNG 30: AKTIVITÄT DER VERSCHIEDENEN PROMOTER-KONSTRUKTE IM SEAP II REPORTER ASSAY IN NIH3T3 ZELLEN. DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUM WERT DER AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS SEAP-BASIC ANGEGBEN.....	78
ABBILDUNG 31: AKTIVITÄT DES SEAP II PROMOTERKONSTRUKTS A-4, NACH KO-TRANSFEKTION EINES RAS EXPRESSIONSPLASMIDS (A-4 + RAS) BZW. DES ENTSPRECHENDEN LEERVEKTORS pDCR (A-4 + pDCR) IN NIH3T3 ZELLEN.....	79
ABBILDUNG 32: AKTIVITÄT DES GESAMTPROMOTER-KONSTRUKTS (A-3) IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA). DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUR AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS pGL3-BASIC ANGEGBEN.....	81
ABBILDUNG 33: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REGULATORISCHEN REGION DES H-REV107-1 GENS MIT POTENTIELLEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN UND PRIMER POSITIONEN. DIE ZUR HERSTELLUNG DER KONSTRUKTE VERWENDETEN PRIMER SIND MIT PFEILEN GEKENNZEICHNET. IN 5'→3'-RICHTUNG SIND DAS DIE PRIMER A BIS F, IN 3'→5'-RICHTUNG DIE PRIMER 1 BIS 3. DIE POTENTIELLEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN SIND UNTERSTRICHEN. DIE STAT-1 BINDUNGSSTELLE ÜBERLAGERT SICH MIT DEN BINDUNGSSTELLEN cREL #1 UND cREL #2 UND IST MIT EINER GESTRICHELTEN LINIE GEKENNZEICHNET. DER GESTRICHELTE PFEIL TSP ZEIGT DEN TRANSKRIPTIONSSTARTPUNKT DER LÄNGSTEN <i>H-REV107-1</i> CDNA AN. DIESER WURDE AUS DER DBTSS DATENBANK ERMITTELT. +1 ZEIGT DEN TRANSLATIONSSTARTPUNKT ATG AN.....	82
ABBILDUNG 34: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IM pGL3 SYSTEM HERGESTELLTEN PROMOTER-KONSTRUKTE. A-3 ZEIGT DEN GESAMTPROMOTER MIT DEN POTENTIELL FUNKTIONELLEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN. AUF DEN WEITEREN KONSTRUKTEN SIND NUR BINDUNGSSTELLEN EINGEZEICHNET, DIE NICHT MEHR AUF DEM NÄCHSTKÜRZEREN KONSTRUKT VORHANDEN SIND. DIE ZAHLEN VOR UND NACH DEM JEWEILIGEN KONSTRUKT ZEIGEN DIE ENTFERNUNG ZUM TRANSLATIONSSTARTPUNKT +1 AN.....	83
ABBILDUNG 35: AKTIVITÄT DER VERSCHIEDENEN PROMOTERKONSTRUKTE IN DER ZELLINIE NIH3T3 IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA). OBERHALB DER BALKEN SIND DIE IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN BALKEN ENTFERNTEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN AUFGEFÜHRT. DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUM WERT DER AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS pGL3-BASIC ANGEGBEN.....	84
ABBILDUNG 36: AKTIVITÄT DER VERSCHIEDENEN PROMOTERKONSTRUKTE IN DER ZELLINIE SKOV-3 IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA). OBERHALB DER BALKEN SIND DIE IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN BALKEN ENTFERNTEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN AUFGEFÜHRT. DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUM WERT DER AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS pGL3-BASIC ANGEGBEN.....	85
ABBILDUNG 37: AKTIVITÄT DER VERSCHIEDENEN PROMOTERKONSTRUKTE IN DER ZELLINIE A27/80 IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA). OBERHALB DER BALKEN SIND DIE IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN BALKEN ENTFERNTEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN AUFGEFÜHRT. DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUM WERT DER AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS pGL3-BASIC ANGEGBEN.....	86

ABBILDUNG 38: AKTIVITÄT DER PROMOTERKONSTRUKTE A-3 UND B-3 IN DER ZELLINIE OVCAR-3, PA-1 UND A27/80 IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA). OBERHALB DER BALKEN IST DIE IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN BALKEN ENTFERNT TRANSKRIFTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLE IRF-1/ISRE AUFGEFÜHRT.	87
ABBILDUNG 39: INDUKTION VON NIH3T3 ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN REAGENZIEN UND MESSUNG DER AKTIVITÄT DES GESAMTPROMOTER-KONSTRUKTS A-3. DIE BEHANDLUNG ERFOLGT FÜR 24 STUNDEN UND BEGINNT 4 STUNDEN NACH DER TRANSFEKTION DER ZELLEN MIT DEM PROMOTERKONSTRUKT. DIE KONZENTRATIONEN BEZEICHNEN DIE ENDKONZENTRATIONEN IM MEDIUM. DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUM WERT DER AKTIVITÄT DES LEEERVEKTORS pGL3-BASIC ANGEGBEN.....	88
ABBILDUNG 40: AKTIVITÄT VERSCHIEDENER PROMOTERKONSTRUKTE IN DER UNBEHANDELTEN ODER MIT TNF- α (1000 U/ML) BEHANDELTEN ZELLINIE NIH3T3 IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA). OBERHALB DER BALKEN SIND DIE IM VERGLEICH ZUM VORHERIGEN KONSTRUKT ENTFERNTE TRANSKRIFTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN AUFGEFÜHRT. DIE AKTIVITÄTEN SIND RELATIV ZUM WERT DER AKTIVITÄT DES LEEERVEKTORS pGL3-BASIC ANGEGBEN.....	90
ABBILDUNG 41: AKTIVITÄT MUTIERTER PROMOTERKONSTRUKTE SOWIE DES METHYLIERTEN GESAMTPROMOTER-KONSTRUKTS (A-3 METHYLIERT) IN DER ZELLINIE NIH3T3	93
ABBILDUNG 42: AKTIVITÄT DER MUTIERTEN PROMOTERKONSTRUKTE IN DEN ZELLINIE A)SKOV-3 UND B) OVCAR-3 IM DUALEN LUCIFERASE REPORTER ASSAY (PROMEGA).....	95
ABBILDUNG 43: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES NF κ B-SIGNALWEGS. DIE AKTIVIERUNG DES TNF-REZEPTORS FÜHRT ZUM PROTEASOMALEN ABBAU VON I κ B UND ZUR TRANSLOKATION VON NF κ B IN DEN KERN (DE MARTIN ET AL, 1999).....	97
ABBILDUNG 44: EINFLUSS DES TNF- α -SIGNALWEGES BZW. DES NF κ B-INHIBITORS DN-I κ B AUF DIE AKTIVITÄT DES GESAMTPROMOTER-KONSTRUKTS A-3 OHNE UND MIT MUTATION DER cREL #1 BINDUNGSSTELLE. DIE BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT 1000 U TNF- α /ML ERFOLGTE FÜR 48 STUNDEN.	98
ABBILDUNG 45: ANALYSE DER <i>H-REV107-1</i> PROMOTERSEQUENZ MIT CPGPLOT. ES ZEIGT SICH, DASS DIE GESAMTE PROMOTERSEQUENZ BIS IN DEN 5'-BEREICH DES GENS HINEIN SEHR CPG-REICH IST.....	99
ABBILDUNG 46: AKTIVITÄT DES, MIT DER METHYLASE SSSI METHYLIERTEN, PROMOTERKONSTRUKTS A-3 METHYLIERT IM VERGLEICH ZUM NICHT METHYLIERTEN KONSTRUKT A-3.....	100
ABBILDUNG 47: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 10 μ G KERNPROTEINE A) UNBEHANDELT NIH3T3 ZELLEN BZW. B) MIT 500 U/ML TNF- α BEHANDELT NIH3T3 ZELLEN AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN....	103
ABBILDUNG 48: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 7 μ G KERNPROTEINE UNBEHANDELT NIH3T3 ZELLEN AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. DIE KOMPETITOREN SIND IM 100-FACHEN ÜBERSCHUSS EINGESETZT WORDEN.....	104
ABBILDUNG 49: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 10 μ G KERNPROTEINE A) UNBEHANDELT NIH3T3 ZELLEN ODER B) CAMP BEHANDELT ZELLEN (ENDKONZENTRATION: 200 μ MOL) AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE	

WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN.	106
ABBILDUNG 50: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 10 µG KERNPROTEINE UNBEHANDELTER NIH3T3 ZELLEN AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. A) KOMPETITOREN SIND IM 100FACHEN ÜBERSCHUSS EINGESETZT. DIE PFEILE ZEIGEN AUF DIE SPOTS DER RADIOAKTIVEN, GEBUNDENEN OLIGONUKLEOTIDE, DIE DURCH EINSATZ NICHT-MARKIERTER, IDENTISCHER OLIGONUKLEOTIDE, ABER NICHT DURCH DEN EINSATZ NICHT-MARKIERTER, MUTIERTER BZW. UNSPEZIFISCHER OLIGONUKLEOTIDE VERDRÄNGT WERDEN. B) DIE PFEILE ZEIGEN AUF DIE BANDEN, DIE BEI VERWENDUNG DES MUTIERTEN OLIGONUKLEOTIDS CREB MT (H-REV107-1) VERSCHWINDEN.	108
ABBILDUNG 51: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 10 µG KERNPROTEINE UNBEHANDELTER NIH3T3 ZELLEN AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. DIE PFEILE ZEIGEN AUF „SUPERSHIFTS“, DIE AUF DIE BINDUNG SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER AN DIE OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEXE BERUHEN.....	111
ABBILDUNG 52: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 10 µG KERNPROTEINE CAMP BEHANDELTER NIH3T3 ZELLEN (ENDKONZENTRATION: 200 µMOL) AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. DER GESCHLOSSENE PFEIL ZEIGT AUF DEN „SUPERSHIFT“, DER AUF DER BINDUNG DES FÜR ATF-2 SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER AN DEN OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEX BERUHT. DER OFFENE PFEIL ZEIGT DEN SPEZIFISCHEN OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEX (OHNE DEM GEBUNDENEN ANTIKÖRPER).	113
ABBILDUNG 53: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 10 µG KERNPROTEINE A)UNBEHANDELTER BZW. B) CAMP BEHANDELTER NIH3T3 ZELLEN (ENDKONZENTRATION: 200 µMOL) AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. DIE JEWEILS ERSTEN OFFENEN PFEILE ZEIGEN AUF DIE SIGNALE, DIE DURCH DEN EINSATZ DES MUTIERTEN OLIGONUKLEOTIDS CREB MT (H-REV107-1) NICHT MEHR VORHANDEN SIND. DER GESCHLOSSENE PFEIL ZEIGT AUF DEN „SUPERSHIFT“, DER AUF DER BINDUNG DES ATF-2 SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER AN DEN OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEX BERUHT. DER UNTERHALB DES GESCHLOSSENEN PFEILS LIEGENDE OFFENE PFEIL ZEIGT AUF DIE STELLE, AN DER SICH ZUVOR DIE BANDE DES OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEX (OHNE DEM GEBUNDENEN ANTIKÖRPER) BEFAND.	115
ABBILDUNG 54: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 5 µG KERNPROTEINE UNBEHANDELTER ZELLEN AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. DIE PFEILE ZEIGEN AUF „SUPERSHIFTS“, DIE AUF DIE BINDUNG DES ATF-2 ANTIKÖRPERS AN DIE OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEXE BERUHEN.	116
ABBILDUNG 55: ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY. IN JEDER SPUR WERDEN 5 µG KERNPROTEINE CAMP BEHANDELTER ZELLEN AUF EIN 4% POLYACRYLAMIDGEL AUFGETRAGEN. GEZEIGT SIND NUR DIE SPEZIFISCHEN BANDEN, DIE WEITER UNTERHALB DER BANDEN LAUFENDE FRONT UNGEBUNDENER	

OLIGONUKLEOTIDE IST ABGESCHNITTEN. DIE PFEILE ZEIGEN AUF „SUPERSHIFTS“, DIE AUF DIE BINDUNG DES ATF-2 ANTIKÖRPERS AN DIE OLIGONUKLEOTID-KERNPROTEIN KOMPLEXE BERUHEN.	117
ABBILDUNG 56: SCHEMATISCHER VERGLEICH DER PROMOTOREN DES MENSCHEN-, MAUS- UND RATTEN <i>H-REV107-1</i> GENS.	
	124
ABBILDUNG 57: EIN MÖGLICHER, GEMEINSAMER EINFLUSS DES MEK-1 UND DES IFN- γ INDUZIERTEN SIGNALWEGS AUF DIE <i>H-REV107-1</i> EXPRESSION.	
	132
ABBILDUNG 58: DER NF κ B-SIGNALWEG FÜHRT ZUR AKTIVIERUNG VON ZIELGENEN. DIES WIRD DURCH DEN REPRESSORS DN κ B VERHINDERT. DN κ B BINDET NF κ B, LÄSST SICH ABER, IM GEGENSATZ ZUM WILDTYP- κ B, NICHT DURCH PHOSPHORYLIERUNG AUS DEM κ B-NF κ B KOMPLEX TRENNEN. NF κ B BLEIBT IM ZYTOSOL GEBUNDEN UND DIE TRANSKRIPTION DER ZIELGENE WIRD UNTERBUNDEN.	
	134
ABBILDUNG 59: MÖGLICHE WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN DEM TNF- α UND DEM IFN- γ INDUZIERTEN SIGNALWEG, DIE ZUR <i>H-REV107-1</i> EXPRESSION FÜHREN. PKR AKTIVIERT NF κ B, DASS IN DEN ZELLKERN TRANSLOKALISIERT. DORT AKTIVIERT DIE KINASE p38 DIE TRANSAKTIVIERENDEN EIGENSCHAFTEN VON NF κ B.	
	135
ABBILDUNG 60: MÖGLICHE SIGNALWEGE, DIE AUSGEHEND VON EINER INDUKTION DURCH IFN- γ UND TNF- α ZU EINER AKTIVIERUNG DER <i>H-REV107-1</i> GENEXPRESSION FÜHREN. DABEI STEHT DIE KINASE PKR IM MITTELPUNKT, DIE DIE AKTIVITÄTEN VON p38, JNK, STAT-1 UND NF κ B POSTIV REGULIERT.	
	139

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: DIE H-REV107 GENFAMILIE WIRD AUCH ALS HRASLS GENFAMILIE BEZEICHNET. INSGESAMT GEHÖREN FÜNF GENE ZU DER FAMILIE, DARUNTER <i>H-REV107-1</i> , DAS AUCH <i>HRASLS3</i> GENANNT WIRD. MIT AUSNAHME VON <i>HRASLS</i> SIND ALLE MITGLIEDER DER GENFAMILIE IN DER REGION 11Q12.3 LOKALISIERT...	7
TABELLE 2: DIE RELATIVEN ÜBEREINSTIMMUNGEN DER AMINOSÄURE-SEQUENZEN DER H-REV107 FAMILIE (NAZARENKO ET AL., 2004). ZUM VERGLEICH WURDEN ALLE NICHT-REDUDANTEN GENBANK CDS EINTRÄGE SOWIE TRANSLATIONEN UND SWISSPROT EINTRÄGE HERANGEZOGEN.....	10
TABELLE 3: PCR-PROGRAMM ZUM EINBRINGEN ZIELGERICHTETER MUTATIONEN.....	28
TABELLE 4: PCR-PROGRAMM ZUR SYNTHESSE DER HUMANEN H-REV107-1 SONDE.....	30
TABELLE 5: PCR-PROGRAMM ZUR SYNTHESSE DER IRF-1 SONDE.....	31
TABELLE 6: PCR-PROGRAMM ZUR SYNTHESSE DER RATTEN H-REV107-1 SONDE.....	31
TABELLE 7: ANNEALING TEMPERATUREN UND ANZAHL DER ZYKLEN FÜR DIE FOLGENDEN PCR PROGRAMME ZUR SYNTHESSE DER PGL3-KONSTRUKTE	32
TABELLE 8: PCR-PROGRAMME ZUR SYNTHESSE DER PGL3-KONSTRUKTE	32
TABELLE 9: ANNEALING TEMPERATUREN UND ANZAHL DER ZYKLEN FÜR DIE FOLGENDEN PCR-PROGRAMME ZUR SYNTHESSE DER SEAP-KONSTRUKTE	33
TABELLE 10: PCR-PROGRAMME ZUR SYNTHESSE DER SEAP-KONSTRUKTE A-2 UND A-4	33
TABELLE 11: PCR-PROGRAMME ZUR SYNTHESSE DER SEAP-KONSTRUKTE B-2, C-2 UND D-2	34
TABELLE 12: PCR-PROGRAMM ZUR DURCHFÜHRUNG VON SEQUENZIERUNGEN	35
TABELLE 13: PCR-PROGRAMM ZUR DURCHFÜHRUNG DER RADIOAKTIVEN SEQUENZIERUNG	36
TABELLE 14: POTENTIELLE TRANSKRIPTIONSFAKTORENBINDUNGSSTELLEN IM BEREICH VON -335 BIS -997 VOM TRANSLATIONSSTARTPUNKT DER <i>H-REV107-1</i> PROMOTERSEQUENZ. (DIE BEZEICHNUNG #1 UND #2 IM FALLE VON cREL UND CCAAT STAMMT NICHT AUS DER DATENBANK, SONDERN DIENT DER ÜBERSICHTLICHKEIT.)	74
TABELLE 15: ZUSAMMENFASSUNG DER MITTELS PCR HERGESTELLTEN PROMOTERKONSTRUKTE. BEGINN UND ENDE DER JEWEILIGEN KONSTRUKTE SIND AUF DEN TRANSLATIONSSTARTPUNKT +1 BEZOGEN.	77
TABELLE 16: ZAHLENWERTE ZUR ABBILDUNG 30. IN DER ZELLINIE NIH3T3 WURDE DER MITTELWERT DER LUCIFERASE-AKTIVITÄT DER EINZELNEN KONSTRUKTE RELATIV ZUM MITTELWERT DER LUCIFERASE AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS SEAP-BASIC GEMESSEN. JEDE TRANSFEKTION WURDE MINDESTENS DREIMAL DURCHGEFÜHRT. DIE STANDARDABWEICHUNG ERGIBT SICH AUS DER MITTELUNG DER WERTE, DIE FEHLERFORTPFLANZUNG WURDE BEIM ERRECHNEN DER RELATIVEN WERTE BERÜCKSICHTIGT. DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-4 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	78
TABELLE 17: ZAHLENWERTE ZUR ABBILDUNG 32. IN DEN ZELLINIEN NIH3T3, SKOV-3, PA-1, A27/80 UND OVCAR-3 WURDE DER MITTELWERT DER LUCIFERASE-AKTIVITÄT DES GESAMTPROMOTER-KONSTRUKTS A-3 RELATIV ZUM MITTELWERT DER LUCIFERASE AKTIVITÄT DES LEERVEKTORS PGL3-BASIC GEMESSEN. JEDE TRANSFEKTION WURDE MINDESTENS DREIMAL DURCHGEFÜHRT. DIE STANDARDABWEICHUNG ERGIBT SICH AUS DER MITTELUNG DER WERTE, DIE FEHLERFORTPFLANZUNG WURDE BEIM ERRECHNEN DER RELATIVEN WERTE BERÜCKSICHTIGT. DIESE VORGEHENSWEISE GILT FÜR ALLE PGL3 PROMOTER ASSAYS UND WIRD BEI DEN FOLGENDEN DARSTELLUNGEN NICHT MEHR BESCHRIEBEN. DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 IN DER ZELLINIE NIH3T3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DES KONSTRUKTS A-3 IN DEN WEITEREN ZELLINIEN BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.	81

TABELLE 18 ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN NIH3T3 ZELLEN (ABB. 35). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	84
TABELLE 19: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN SKOV-3 ZELLEN (ABB. 36). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	85
TABELLE 20 ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN A27/80 ZELLEN (ABB. 37). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	86
TABELLE 21: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN OVCAR-3, PA-1 UND A27/80 ZELLEN (ABB. 38). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE JEWEILS GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	87
TABELLE 22 ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN NIH3T3 ZELLEN (ABB. 39). DER WERT FÜR DAS UNBEHANDELTE GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN MESSUNGEN BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.	89
TABELLE 23: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN NIH3T3 ZELLEN (ABB. 40). DER WERT FÜR DAS IN UNBEHANDELTE NIH3T3 ZELLEN TRANSFIZIERTE GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.	90
TABELLE 24: TABELLE DER IN DIE POTENTIELLEN TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN EINGEFÜHRTEN MUTATIONEN. IM VERGLEICH WERDEN DIE ERKENNUNGSSEQUENZEN (ES) DES WILDTYPS (WT) UND DER MUTIERTEN FORM (MT) GEZEIGT. EINGEFÜHRTE MUTATIONEN SIND MIT GROßEN BUCHSTABEN GEKENNZEICHNET. DIE POSITION GIBT DIE POSITION DER BINDUNGSSTELLE INNERHALB DES PROMOTERS AN. (TRANSLATIONSSTART = +1)	92
TABELLE 25: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN NIH3T3 ZELLEN (ABB. 41). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	93
TABELLE 26: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN SKOV-3 3 UND OVCAR-3 ZELLEN (ABB. 42). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE JEWEILS GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%.....	95
TABELLE 27: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN UNBEHANDELTEN ODER MIT TNF- α (1000U/ML) BEHANDELTEN NIH3T3 ZELLEN (ABB. 44). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DER WEITEREN KONSTRUKTE BEZIEHEN SICH AUF DIESE 100%. 98	
TABELLE 28: ZAHLENWERTE ZUM REPORTER ASSAY IN NIH3T3 ZELLEN (ABB. 46). DER WERT FÜR DAS GESAMTPROMOTER-KONSTRUKT A-3 WURDE GLEICH 100% GESETZT. DIE WERTE DES METHYLIERTEN A-3 KONSTRUKTS BEZIEHT SICH AUF DIESE 100%.	100
TABELLE 29: ÜBERSICHT ÜBER DIE IM VERLAUF DER EXPERIMENTE VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE.....	101
TABELLE 30: ZUM SPEZIFISCHEN NACHWEIS GEBUNDENER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN EINGESETZTE ANTIKÖRPER	110
TABELLE 31: POTENTIELLE TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN IM BEREICH –1000 BP BIS – 7300 BP..	120
TABELLE 32: IFN- γ ABHÄNGIGE, POTENTIELLE BINDUNGSSTELLEN 3' DES <i>H-REV107-1</i> TRANSKRIPTIONSSTART-PUNKTS	121

TABELLE 33: POTENTIELLE TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN IM MAUS PROMOTER	122
TABELLE 34: POTENTIELLE TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN IM HUMANEN PROMOTER	123
TABELLE 35: POTENTIELLE TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN IM RATTEN PROMOTER.....	123

Liste der Abkürzungen

A	Adenin
A (Ala)	Alanin
Ab	Antibody
APS	Ammoniumpersulphat
bp	Basenpaare
BRE	TFIIB-Recognition Element
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
C (Cys)	Cystein
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CDS	Coding Sequence
CMV	Cyto Megalie Virus
D (Asp)	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosin Triphosphat
DCE	Downstream Core Element
dCTP	Desoxycytosin Triphosphat
dGTP	Desoxyguanin Triphosphat
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
DPE	Downstream Core Promoter Element
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymine Triphosphat
E (Glu)	Glutaminsäure
G	Guanin
G (Gly)	Glycin
GAS	Gamma Activated Sequence
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GTP	Guanin-Triphosphat
H (His)	Histidin
HTGS	High Throughput Genome Sequences
I (Ile)	Isoleucin

IFN	Interferon
Inr	Initiator-Element
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
ISRE	Interferon Stimulated Response Element
L (Leu)	Leucin
LB	Luria-Bertani
mt	mutiert
MTE	Motif Ten Element
N (Asn)	Asparagin
PBS	Phosphate Buffered Salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PJ	Peutz-Jeghers
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Restriktionsschnittstelle
S (Ser)	Serin
SDS	Sodium Dodecyl Sulphat
SEAP	Secreted Alkaline Phosphatase
T	Thymin
T (Thr)	Threonin
TAD	Transkriptionale Aktivierungsdomäne
TAF	TBP assoziierter Faktor
TBP	TATA-Box Bindendes Protein
Tf	Transkriptionsfaktor
Tm	Melting Temperature
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
TSP	Transkriptionsstartpunkt
W (Trp)	Tryptophan
wt	Wildtyp
Y (Tyr)	Tyrosin

Zusammenfassung

Das Tumorsuppressor Gen *H-REV107-1* wird in normalen Geweben ubiquitär exprimiert, während die Expression in humanen Mamma-, Ovarial-, und Lungentumoren unterdrückt ist. *H-REV107-1* hemmt das Tumorstadium *in vitro* und *in vivo*. Die Expression und Regulation des *H-REV107-1* Gens wurde in verschiedenen, humanen Zelllinien untersucht.

In den Tumor Zelllinien A27/80, OVCAR-3, SKOV-3, RCC26, MZ1257 und in der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 wird die *H-REV107-1* Expression durch IFN- γ induziert. In OVCAR-3, A27/80, SKOV-3 und RCC26 und in der humanen Ovarialepithelzelllinie HOSE wurde eine Korrelation der *H-REV107-1* und der *IRF-1* Expression nach Induktion mit IFN- γ gezeigt. *H-rev107-1* konnte in NIH3T3 auch nach konditionaler IRF-1 Expression, Proteinsynthese-unabhängig, nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass *H-rev107-1* ein direktes Zielgen von IRF-1 ist.

In der KRAS-transformierten Rattenzelllinie ROSE199A2/5 und in der humanen Teratokarzinomzelllinie PA-1 ließ sich die *H-rev107-1* Expression durch Unterdrückung des MEK/ERK-Signalwegs mit dem MEK-1 Inhibitor PD98059 aktivieren. Die Hemmung des PI3K-Signalwegs mit dem Inhibitor LY294002 führte zu keiner Re-Expression von *H-rev107-1*. In Dies bedeutet, dass *H-REV107-1* durch mindestens zwei verschiedene Signalwege, IFN- γ und MEK/ERK, reguliert wird.

Die H-REV107-1 Promoter Region wurde *in silico* bestimmt, *in vitro* amplifiziert und in das pGL-3 basic Luciferase Reporter Plasmid kloniert. Der H-REV107-1 Promoter enthält keine TATA-Box, sondern ein Initiator Element sowie, in dem für eine TATA-Box definierten Abstand, eine ATF-2 Bindungsstelle. Die Inkubation von transient transfizierten Zellen mit TNF- α , cAMP und IFN- γ steigerte die Luciferase Aktivität unter der Kontrolle des mit 980 bp längsten Promoter Konstrukts. Mit Hilfe von verschiedenen Deletionskonstrukten und Konstrukten, in denen potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen mutiert waren, wurden die regulatorischen Bereiche des Promoters bestimmt. Mutationen der IRF-1 und der STAT-1 Bindungsstellen, die potentielle Ziele des IFN- γ Signalwegs darstellen, ergaben keinen Verlust der Luciferase Aktivität. Eine Mutation der cRel-Bindungsstelle, potentiell über NF κ B reguliert, resultierte in einer Luciferase Aktivität von nur 9% des Wildtyp Promoterkonstrukts. Die Mutation der CREB/ATF-2 Bindungsstelle reduzierte die Luciferase Aktivität auf 37%. Die Ko-Transfektion des Gesamtpromoter-Konstrukts mit einem NF κ B Suppressor, dem dominant negativen I κ B Expressionsplasmid, reduzierte die Luciferase Aktivität um 53%. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NF κ B und ATF-2 die *H-REV107-1* Expression positiv regulieren.

Um eine biologische Funktion der durch Mutation inaktivierten c-Rel und CREB/ATF-2 Bindungsstellen zu zeigen, wurden Gel-Retardationsassays (EMSA) durchgeführt. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte die Bindung von ATF-2 an das, die CREB/ATF-2 Bindungsstelle enthaltende, P³²-markierte, Oligonukleotid gezeigt werden. Obwohl auch das, die c-Rel-Bindungsstelle enthaltende, Oligonukleotid spezifisch von einem Protein gebunden wurde, konnte dieses nicht mit einem Antikörper der NF κ B-Familie identifiziert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *H-REV107-1* durch eine IFN- γ induzierte, möglicherweise PKR vermittelte, Signalkette von den Faktoren IRF-1 und ATF-2 direkt, sowie von NF κ B indirekt, reguliert wird.

Schlagwörter: H-REV107-1, ATF-2, IRF-1, NF κ B, Tumorsuppressor

Abstract

The *H-REV107-1* class II tumor suppressor gene is ubiquitously expressed in normal tissues and down-regulated in human breast, ovarian and lung tumors. *H-REV107-1* has the capacity to suppress growth of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. In A27/80, OVCAR-3, SKOV-3, RCC26, MZ1257 and ROSE199 cell lines *H-REV107-1* is up-regulated after treatment with IFN- γ . A NIH3T3 cell line harboring an estrogen-inducible IRF-1/hER fusion protein showed a protein synthesis independent up-regulation of *H-rev107-1* expression after induction of IRF-1. The parental NIH3T3 cell line showed no induction of *H-rev107-1* expression after treatment with estrogen. This demonstrates that *H-rev107-1* is a direct target of IRF-1. Furthermore, a time course dependent correlation between *H-REV107-1* and *IRF-1* expression was confirmed in OVCAR-3 and A27/80 cell lines. Additionally, there was a correlation between *H-REV107-1* and *IRF-1* expression in the immortalized human ovarian epithelial cell line HOSE and in the carcinoma cell lines SKOV-3 and RCC26.

Inhibition of the MEK/ERK pathway in a RAS-transformed derivate of immortalized rat ovarian surface epithelial cells, ROSE199 A2/5, using the MEK1 inhibitor PD 98059, but not the inhibitor of the PI3K pathway LY 294002, leads to a restored expression of *H-rev107-1*. In the teratocarcinoma cell line PA-1 but not in the A27/80 or OVCAR-3 cell lines, PD 98059 partially restored expression of *H-REV107-1*. Therefore, *H-REV107-1* can be a target of the MEK/ERK-pathway in the ROSE199 A2/5 and the PA-1 cell line. Thus, *H-REV107-1* is regulated by at least two different pathways.

To understand the regulatory mechanisms of the expression of the *H-REV107-1* gene, the putative promoter region was analyzed *in silico*. The sequence was amplified and cloned into the pGL3-basic Luciferase Reporter plasmid (Promega™). Induction of the promoter constructs with TNF- α , cAMP and IFN- γ increased the luciferase activity. Several deletions constructs and constructs with putative transcription factor binding sites mutated were used to narrow down the important regulatory elements of the promoter. While mutations of an IRF-1 binding site and a STAT-binding site as potential targets of the IFN- γ signaling pathway did not reduce the luciferase activity, the mutations of a c-Rel binding site and a CREB/ATF-2 binding site decreased the luciferase activity by 91% and 63%, respectively. Co-transfection of the full length promoter construct with a dominant negative I κ B expression plasmid, a repressor of NF κ B activation, reduced the luciferase activity to 47%. As a result of the investigation *H-REV107-1* is directly regulated by IRF-1 and probably indirectly regulated by NF κ B and the MEK/ERK signaling pathway.

To show a biological function of the CREB/ATF-2 and the c-Rel binding site, an Electro Mobility Shift Assay (EMSA) was performed, using a P³²-labeled oligonucleotid, which included the CREB/ATF-2 or the c-Rel binding site. The binding of ATF-2 to the CREB oligonucleotid was demonstrated by the use of a specific antibody. While there was also a specific protein binding to the cRel binding site, none of the used antibodies of the NF κ B family resulted in a supershift with the cRel oligonucleotid. The ATF-2 binding site in the posititon – 30 bp - -23 bp of the human, TATA-less *H-REV107-1* promoter replaces the TATA-like element, which can be found in the *H-rev107-1* promoter of rat and mouse.

Keywords: *H-REV107-1*, ATF-2, IRF-1, NF κ B, tumor suppressor

1 Einleitung

1.1 Die Tumorentstehung

Zur Entstehung eines Tumors sind verschiedene Schritte notwendig. Im allgemeinen werden drei Phasen der Tumor-Entstehung unterschieden: Initiation, Promotion und Metastasierung. Betrachtet man die biologischen Änderungen, die notwendig sind, um aus einer normalen Zelle einen Tumor entstehen und metastasieren zu lassen, so sind folgende Mechanismen von Bedeutung: Übergehen der Zellzyklusblockade, Auslösen eigener Wachstumssignale, Induktion der Angiogenese, Auflösen des Zellverbandes und Metastasierung, Hemmung der Apoptose sowie Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Gene, die in einem oder mehreren dieser Prozesse eine wichtige Rolle spielen, bezeichnet man je nach ihrer Funktion als Onkogene oder Tumorsuppressorgene. Onkogene sind Gene, die in ihrer Aktivität das Tumorstadium positiv beeinflussen. Als Tumorsuppressorgene bezeichnet man Gene, die in ihrer normalen Funktion einer Transformation der Zelle entgegenstehen.

1.1.1 Onkogene

Onkogene besitzen in Zellen eine normale, wachstumsfördernde Funktion. Sie werden hier auch als Proto-Onkogene bezeichnet. Proto-Onkogene können durch Mutation, Amplifikation oder Translokation verändert und ihre Genprodukte so in einen permanent aktiven Zustand überführt werden. Die konstitutive Aktivität des Genprodukts führt z.B. über die Signalübertragung zu permanent aktivierten Signalwegen. Das natürliche Gleichgewicht der verschiedenen Signalwege der Zelle wird so nachhaltig gestört und es kommt zu einem Fehlverhalten dieser Zelle, z.B. dem Übergehen der Zellzyklusblockade.

Ein bekanntes Beispiel für Onkogene sind die *RAS* Gene. Diese Gene kodieren für die membrangebundenen und zur Gruppe der kleinen, GTP-bindenden Proteine gehörenden RAS Proteine, die verschiedene, mitogene Signalwege aktivieren. Ihre besondere Bedeutung in der Tumorentstehung wird an Hand ihrer Beteiligung in verschiedenen Tumoren deutlich. So ist jeweils eines der drei *RAS* Gene *HRAS*, *KRAS* oder *NRAS* in 90% der Magen-, in 50% der Darm-, in 50% der Schilddrüsen- und in 30% der Lungentumore mutiert (Bos, 1989). In seiner aktiven Form bindet RAS Guanin-Triphosphat (GTP). Die Hydrolyse des GTP zu GDP, und damit die Inaktivierung von RAS, wird durch die RAS-eigene GTPase Funktion und über GAP Proteine (GTPase Activating Protein) gesteuert. Die bekannten Mutationen, die zum Austausch der Aminosäuren 12, 13, 59 oder 61 führen, bewirken, dass GAP Proteine nicht mehr binden und RAS in einer konstitutiv aktiven Form vorliegt.

Ein anderes Beispiel ist das *Bcr-Abl* Onkogen, welches durch die „Philadelphia Chromosom Translokation“ entsteht. Durch diese chromosomale Translokation entsteht das Fusionsprotein Bcr-Abl, das konstitutiv aktiv ist und ebenfalls unablässig mitogene Signalwege stimuliert (u. a. über RAS). Bcr-Abl ist so für die Entstehung von Leukämien mitverantwortlich (Kurzrock et al., 1988).

Eine weitere Möglichkeit der verstärkten Aktivierung von Onkogenen ist die Überexpression. Bekannte und in der Tumorentstehung wichtige Beispiele sind die Tyrosin-Kinase Rezeptoren (z.B. EGF, HER2) die, ausgehend von ihrer zytoplasmatischen Domäne, proliferationsfördernde Signalwege aktivieren. Die Überexpression beruht meist auf Gen-Amplifikationen.

1.1.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene sind die funktionellen Gegenspieler der Onkogene, indem sie die Zellteilung kontrollieren. In vielen Fällen führt der Verlust ihrer Funktionalität zu einer unkontrollierten Aktivität der Onkogene (Kuivaniemi, 1989).

1.1.2.1 Klasse I Tumorsuppressorgene

Der Verlust der Tumorsuppressorgen-Aktivität kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Es besteht die Möglichkeit einer Beschädigung des Gens durch Mutation oder Deletion. Tumorsuppressorgene, die auf Grund dieser Mechanismen irreversibel inaktiviert worden sind, bezeichnet man als Klasse I Tumorsuppressorgene.

1.1.2.1.1 Expressionsverlust durch Deletion und Mutationen

Ein seit langem bekanntes und mit am Besten untersuchtes Klasse I Tumorsuppressorgen ist das Gen für das Retinoblastoma (Rb) Protein. Rb ist das am häufigsten durch Mutation oder Deletion veränderte Gen in Tumoren des Menschen (El-Deiry et al., 1993). Das Rb Protein kontrolliert die Zellteilung, indem es den G₁-Kontrollpunkt des Zellzyklus überwacht und so den Eintritt in die S-Phase inhibiert. Dies führt zur terminalen Differenzierung der Zelle. Dieser Prozess wird in erster Linie über den Rb-E2F Komplexes gesteuert, in dem Rb, durch Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F, dessen aktivierende Eigenschaften hemmt. Dadurch wird die Expression verschiedener, den Zellzyklus aktivierender Gene (z.B. CyclinE oder E2F selbst), verhindert. Die Stabilität des Rb-E2F Komplexes ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins. Dieser wird von den Proteinkomplexen CyclinD/CDK4/6 und CyclinE/CDK2 reguliert. Die Phosphorylierung von Rb führt zur Aufspaltung des Rb-E2F Komplexes, wie es z.B. von Wachstumsfaktoren über die Expression von CyclinD1 vermittelt wird, und damit zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Durch den Verlust des Tumorsuppressorgens Rb wird das Proto-Onkogen E2F zum Onkogen. In vielen Tumoren ist Rb deletiert oder mutiert. Der Ausfall dieses bedeutenden Zellzyklusregulators kann zu Retinoblastomen, Osteosarkomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen führen (Weinberg, 1995; Tuveson und Jacks, 1999; Stevaux und Dyson, 2002; Sherr und Roberts, 1999).

Ein anderes, weit weniger gut untersuchtes Beispiel ist das *LKB1/STK11* Gen. Das Protein ist eine Serin-Threonin Kinase mit ungeklärter, biologischer Funktion. *In vitro* Studien zeigen eine wachstumsunterdrückende Aktivität der Kinase (Tiainen et al., 1999). Eine Keimbahn Mutation des Gens führt zur Ausbildung des Peutz-Jeghers (PJ) Syndroms. Patienten mit dieser Erkrankung besitzen ein hohes Risiko für die Entstehung eines gastrointestinalen oder extraintestinalen Tumors. In 25 % der untersuchten Lungenadenokarzinome und in 20 % der untersuchten Lungentumorzelllinien aus PJ-Patienten sind Punktmutationen in *LKB1/STK11* gefunden worden. Sechs von sieben dieser Mutationen sind Nonsense-Mutationen, die siebte führt zu einer Verschiebung

des Leserahmens. Alle diese Mutationen führen zu einem verstümmelten LKB1/STK11-Protein, welches eine nur unvollständige, katalytische Domäne besitzt (Sanchez-Cespedes et al., 2002).

1.1.2.2 Klasse II Tumorsuppressorgene

Neben den irreversiblen Störungen der genomischen Integrität besteht auch die Möglichkeit, dass die Expression eines Gens durch einen reversiblen Mechanismus verhindert wird. Das Gen selbst wird dabei nicht verändert. Die Expressionshemmung kann durch eine Inaktivierung positiver Regulatoren (z.B. Transkriptionsfaktoren bzw. deren Aktivatoren), oder durch die Aktivierung negativer Regulatoren (z.B. Inhibitoren) erfolgen. Des weiteren kann auch die Methylierung der im Promoter enthaltenen CpG-Inseln, Deacetylierung oder Methylierung von Histonen und daraus resultierende Chromatinänderungen zu einer Unterdrückung der Genexpression führen. Tumorsuppressorgene, deren Expression durch einen der genannten Mechanismen gehemmt wird, bezeichnet man als Klasse II Tumorsuppressorgene. Auch als Klasse I definierte Tumorsuppressorgene können durch einen Klasse II Mechanismus gehemmt werden. Beispiele hierfür sind die Gene *HIC-1* oder *p16*. Die chromosomale Region, auf der *HIC-1* lokalisiert ist, ist in vielen Gehirn- und Brusttumoren deletiert, dagegen ist *HIC-1* in einer großen Anzahl von epithelialen und hematopoetischen Tumoren methyliert (Trink et al., 1998). Im Zusammenhang mit dem Klarzell Sarkom sind für das *p16* Gen sowohl Punkt Mutationen als auch homozygote Deletionen beschrieben (Takahira et al., 2004). In gastritischen Dysplasien jedoch ist *p16* häufig hypermethyliert (Sun et al., 2004).

1.1.2.2.1 Expressionsverlust durch Aktivierung von Suppressoren

Die erhöhte Aktivität von Onkogenen kann zur Expression, Translation oder direkten Aktivierung eines Suppressors führen, der dann die Expression von Tumorsuppressorgenen verhindert. So zeigt Watnick *et al.* die Repression des anti-angiogenen Faktors *Thrombospondin-1 (Tsp-1)* durch den Transkriptionsfaktor c-Myc. c-Myc wird über einen, vom konstitutiv aktiven HRAS-Onkoprotein ausgehenden, Signalweg über PI3K, Rho und ROCK durch Phosphorylierung aktiviert. Durch die Suppression von *Tsp-1* wird die Angiogenese stimuliert und ein stärkeres Tumorwachstum ermöglicht (Watnick et al., 2003).

1.1.2.2.2 Expressionsverlust durch Inaktivierung regulatorischer Faktoren

Nicht nur die Aktivierung von Onkogenen, auch die Inaktivierung von positiven Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, kann dramatische Auswirkungen auf die Expression von Klasse II Tumorsuppressorgenen haben. Häufig handelt es sich um komplexe Zusammenhänge, bei denen Ursache und Wirkung nicht sofort zuordenbar sind. Ein solches Beispiel ist der Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung des *p14^{ARF}* Gens und der Hemmung der Tumorsuppressorgene *Maspin* und *KAI1*. Das Tumorsuppressorprotein *p14^{ARF}* verhindert normalerweise den Nukleus-Zytosol Transport des Onkoproteins MDM2 und lokalisiert es im Zellkern, hauptsächlich im Nukleolus (Zhang und Xiong, 1999). Ist das *p14^{ARF}* Gen hypermethyliert, wird es nicht mehr exprimiert und der MDM2 Nukleus-Zytosol Transport nicht länger blockiert. Unter diesen Bedingungen findet sich MDM2 sowohl im Zellkern als auch im Zytosol (Esteller et al., 2001). Im Zytosol führt MDM2 zum Abbau des Tumorsuppressors p53, gleichzeitig blockiert freies MDM2 im Zellkern die transkriptionale Aktivität von p53 (Prives, 1998). Die Inhibierung des Transkriptionsfaktors p53 führt schließlich zum Verlust der Expression verschiedener Tumorsuppressorgene. Zu diesen Genen gehören neben bekannten Zellzyklusregulatoren auch das Gen *Maspin*, das bei Brusttumorzellen die Ausbildung von Metastasen und die

Tumorzellen-Invasion verhindert (Zou et al., 1994; Zou et al., 2000), und *KAI1*, das in Tumoren der Prostata als Metastasierungs-Suppressor von Bedeutung ist (Mashimo et al., 1998).

1.1.2.2.3 Expressionsverlust durch epigenetische Veränderungen

DNA-Methylierung ist ein durch Methyltransferasen (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) katalysierter Prozess, der zu einem definierten Methylierungsmuster während der Embryogenese führt und dieses Muster bei der Replikation der adulten Zelle immer wieder reproduziert. Ca. 80% der CpG-Dinukleotide des Genoms sind methyliert, wobei das Cytosin der CpG-Dinukleotide zu 5'-Methylcytosin umgewandelt wird. Die *de novo* Methylierung, sowie die „erhaltende“ Methylierung findet aber auch in somatischen Zellen statt und ist kein statischer sondern ein dynamischer Vorgang (Szyf, 2003). Dieser Prozess, der über die Inaktivierung regulatorischer Regionen zur Hemmung der Genexpression führt, spielt beim genomischen Imprinting, bei der X Chromosom-Inaktivierung, bei der Alterung und bei der gewebespezifischen Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle (Li et al., 1993; Tate und Bird, 1993; Reik und Walter, 2001).

Die Inaktivierung der Promoteraktivität beruht auf einer direkten, sterischen Behinderung der Transkriptionsfaktor-Bindung, wenn die methylierten CpG-Inseln in direkter Nähe von Transkriptionsfaktorbindungsstellen liegen oder mit diesen überlappen. Des weiteren führt eine mit der Methylierung einhergehende Änderung der Chromatinstruktur zu einer geschlossenen, für Proteine nicht mehr zugänglichen DNA-Struktur, wodurch die Genexpression indirekt gehemmt wird.

In Krebszellen werden häufig hypermethylierte Promoterregionen von Tumorsuppressorgen gefunden. Dies führt zu einer verringerten oder fehlenden Genexpression, wie z.B. bei den Genen *p21^{WAF1}*, *p16* oder *p15*, deren Genprodukte als CDK-Inhibitoren wirken (Chen et al., 2000; Herman et al., 1995; Ng et al., 1997). In hepatozellulärem Tumorgewebe zeigen bei 51 untersuchten Fällen eine ganze Reihe von Tumorsuppressorgen eine Methylierung ihrer Promoterregionen. Die Tumorsuppressorgene *SOCS-1* sind in 65%, *GSTP* in 54%, *APC* in 53%, *E-cadherin* in 49% und *p15* in 49% der untersuchten Proben methyliert. Im direkten Vergleich von nicht-tumorigenem Gewebe mit Hepatokarzinomen zeigen 53% der malignen Proben eine Promoter Methylierung von drei oder mehr Tumorsuppressorgen, jedoch keine der normalen Proben (Yang et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Tumortypen gemacht, dabei zeigten sich Überlappungen und Unterschiede zwischen den jeweiligen Listen der methylierten Gene.

Wie in Tumorzellen Gene Sequenz-spezifisch von Methyltransferasen hypermethyliert werden, ist noch ungeklärt. Di Croce *et al.* zeigen die Rekrutierung der Methyltransferasen durch das, in manchen Leukämien vorhandene und durch eine Translokation entstandene, Fusionsprotein PML-RAR an den RAR β 2-Promoter. Zum Nachweis dieser Hypothese wurden Zellen mit einem RAR β -Luciferase Reporterplasmid transfiziert und eine Korrelation zwischen der Methylierung des endogenen RAR2 β -Promoters und der Methylierung des Promoters des RAR β -Luciferase Reporterplasmids gemessen. DiCroce schlägt vor, dass ein Teil des PML-RAR Fusionsproteins die Methyltransferase bindet, während der andere Teil als Transkriptionsfaktor an den Promoter des Zielgens andockt und so die Methyltransferase zum Promoter gelenkt wird (Di Croce et al., 2002). Diese Beweisführung ist von Esteller *et al.* in Frage gestellt worden, der Leukämien, die das PML-RAR Fusionsprotein besitzen und Subtypen der Leukämien, die das Fusionsprotein nicht besitzen, miteinander verglichen hat und keinen Unterschied in der Häufigkeit der RAR2 β Methylierung feststellen konnte (Esteller et al., 2002).

Trotzdem ist die Bindung zwischen Methyltransferasen und Transkriptionsfaktoren ein möglicher Mechanismus, der jedoch als Mechanismus für die Methylierung der bekannten Tumorsuppressorgene erst noch nachgewiesen werden muss.

1.1.2.3 Klasse II Tumorsuppressorgene im therapeutischen Ansatz

Um für therapeutische Zwecke Klasse II Tumorsuppressorgene reaktivieren zu können, gilt es herauszufinden, auf Grund welchen Auslösers und an welcher Stelle innerhalb des komplexen Signalnetzwerkes eine Veränderung eintritt, die zum Verlust der Expression des Tumorsuppressorgens führt. Für die meisten Klasse II Tumorsuppressorgene ist dies nicht bekannt. Einige der Demethylierungsreagenzien, die die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen aufheben sollen, befinden sich in der Phase der klinischen Tests, darunter die Dnmt1 Inhibitoren 5-Aza-2'-Desoxycytidin und MG98 sowie verschiedene Dnmt1 Antisense-Oligonukleotide (Szyf, 2003). In einer Analyse von 200 Patienten, die an Akuter Myeloischer Leukämie erkrankt und mit 5'-Azacytidin behandelt wurden, wurde bei 20% eine vollständige Remission der Erkrankung erreicht. Bei der Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin lag der Anteil der vollständigen Remission sogar über 30% (Zhou et al., 1997). Eine neuere Studie zeigt bei der Behandlung von Akuter und Chronischer Myeloischer Leukämie mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin eine positive Reaktion bei 65% der Patienten (Issa et al., 2004). Trotz des erfolgreichen Einsatzes demethylierender Agenzien bleibt die hohe Toxizität dieser Substanzen ein Problem in der klinischen Anwendung. Daher ist die Entwicklung neuer, spezifisch wirkender Substanzen ein Schwerpunkt der aktuellen, pharmazeutischen Forschung.

1.2 H-REV107-1 ist ein Klasse II Tumorsuppressorgen

1.2.1 Expression von H-REV107-1 in normalem Gewebe, in Tumoren sowie normalen und malignen Zelllinien

1994 wurde das *H-rev107-1* Gen der Ratte aus einer subtraktiven cDNA Bank isoliert. Diese Bank entstand durch physikalische Subtraktion der cDNA zweier Zelllinien, der HRAS-transformierten Ratten Fibroblastenzelllinie FE8 und der daraus hervorgegangenen, phänotypischen Revertante F9. F9 exprimiert immer noch das *HRAS* Onkogen, hat jedoch im Gegensatz zu FE-8 seine malignen Eigenschaften verloren. *H-rev107-1* wird in den HRAS-transformierten FE-8 Zellen nicht, in den F9 Revertanten jedoch deutlich exprimiert. Somit konnte es aus der subtraktiven cDNA-Bank isoliert werden (Hajnal et al, 1994).

Des Weiteren zeigen auch die, gegen eine Transformation mit HRAS resistenten Zelllinien REF52 (Ratten Embryonale Fibroblastenzelllinie) und EK-3 (ein Maus NIH3T3 Derivat), ein hohes *H-rev107-1* Expressionsniveau, während die für eine Transformation sensitiven Zelllinien, wie z.B. NIH3T3 oder 208F, ein sehr niedriges Expressionsniveau aufweisen. Durch Transfektion der REF52 Zellen mit dem nukleären Adenovirus Onkogen E1A kann die *H-rev107-1* Expression auf das 208F Niveau gedrückt werden. Die Resistenz der REF52 Zellen gegen die Transformation durch HRAS wird durch die Transfektion mit E1A aufgehoben (Hajnal et al, 1994).

Während *H-rev107-1* in normalen Geweben der Ratte ubiquitär exprimiert wird, kann in Gewebe von Leber-, Nieren-, und Pankreastumoren sowie in experimentellen Mammatumoren *Hras*-transgener Mäuse zwar eine geringe Menge *H-rev107-1* mRNA, jedoch kein Protein nachgewiesen werden (Sers et al., 1997).

Auch in normalen humanen Geweben wird *H-REV107-1* ubiquitär exprimiert. In Tumorzelllinien kann das Transkript nur in acht von 27 untersuchten Tumorzelllinien detektiert werden. Auch in primären Plattenepithelkarzinomen kann kein *H-REV107-1* gefunden werden (Husmann et al., 1998).

1.2.2 *H-rev107-1* besitzt wachstumshemmende Eigenschaften

Die Transfektion und Überexpression der *H-rev107-1* cDNA in der HRAS-transformierten Ratten Hepatomazelllinie ANR4 sowie in der Fibroblastenzelllinie FE8 reduziert das Koloniewachstum um bis zu 75%. Nach einer stabilen Transfektion mit dem *H-rev107-1* cDNA Konstrukt zeigen im Western Blot nur fünf von 13 Klonen ein erhöhtes Niveau an H-rev107-1 Protein. Eine Immunofluoresenzanalyse dieser fünf Klone hat ergeben, dass nur 20-50% der Zellen das Protein exprimieren. Diese Zahl verringert sich nach einigen Wochen in Kultur bis auf unter 10%. Diese Reduktion der Kolonienanzahl sowie die *in vitro* Selektion gegen H-rev107-1 Protein exprimierende Zellen zeigt sich in der immortalen Zelllinie 208F nicht (Sers et al., 1997).

Injiziert man *H-rev107-1* überexprimierende FE-8 Zellen in Nacktmäuse, so zeigen diese, bis zum Tag 11, ein vermindertes Tumorwachstum. Zellen, die aus solchen Tumoren in Kultur übernommen werden, zeigen einen Anteil von ca. 15% H-rev107-1 Protein exprimierender Zellen, im Vergleich zu dem Anteil von ca. 55% positiver Zellen, die den Mäusen gespritzt wurden. Auch *in vivo* erfolgt eine Selektion gegen *H-rev107-1* exprimierende Zellen.

1.2.3 *H-REV107-1* liegt in humanen Tumoren als Wildtyp-Sequenz vor

Die Überexpression von HRAS in der Zelllinie 208F führt zum Verlust der *H-rev107-1* Expression, die jedoch in der Revertante F9 wieder hergestellt ist. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass der Verlust der Expression auf einer reversiblen Veränderung in der Zelle beruht, die den Mechanismus der Regulation betrifft.

Um in humanen Geweben die Möglichkeit einer Mutation auszuschließen, wurden verschiedene Tumorgewebe aus Ovar und Lunge auf Mutationen im *H-REV107-1* Gen untersucht. Da keine Mutationen entdeckt werden konnten, kann man davon ausgehen, dass das *H-REV107-1* Gen zumindest in diesen Geweben nicht durch Mutationen oder Deletionen, sondern auf Grund einer Veränderung im Regulationsmechanismus in seiner Expression supprimiert wird. *H-REV107-1* ist somit ein Klasse II Tumorsuppressorgen mit einer bislang unbekannten Funktion.

1.3 Die H-REV107 Familie

1.3.1 Entdeckung und Funktion der Mitglieder der H-REV107 Gen-Familie

Als erstes Gen dieser Familie wurde 1994 von Hajnal *et al.* das *H-rev107-1* Gen der Ratte beschrieben. 1998 wurde mittels differentieller PCR das *RARRES3/TIG3* Gen von DiSepio *et al.* nach Induktion einer primären humanen Keratinozytenzelllinie mit dem synthetischen Retinsäure-Derivat Tazaroten gefunden (DiSepio *et al.*, 1998). Gleichzeitig konnten auch Husmann & Sers *et al.* das Gen isolieren. Das *RARRES3/TIG3* Gen weist eine signifikante Homologie zu *H-rev107-1* auf. Als drittes Gen der Familie wurde 1999 von Akiyama *et al.* mit Hilfe differentieller Subtraktion zweier Maus Zelllinien das *Ac-1* Gen isoliert. In der undifferenzierten, chondrogenen Maus Zelllinie ATDC5 wurde *Ac-1* mRNA gefunden, die undifferenzierte, pluripotente Maus Zelllinie C3H10T1/2 exprimiert kein *Ac-1*. Im Menschen wird *AC-1* überwiegend im Skelett-Muskel, dem Herz, dem Hippocampus und im Knochengewebe exprimiert (Akiyama *et al.*, 1999). 1998 wurde von Husmann *et al.* das humane Homolog zu *H-rev107-1* und 2001 von Ito *et al.* das humane Homolog zu *Ac-1* isoliert (Husmann *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2001). Alle drei Gene zeigen die Eigenschaft, dass sie nach Expression in RAS transformierten Zelllinien die Kolonienanzahl reduzieren und das Zellwachstum deutlich verringern. Über zwei weitere Mitglieder der Gen-Familie, *HRLP5* (GeneID: 117245) und *HRASLS2* (GeneID: 54979), ist außer der cDNA- und der Proteinsequenz sowie der chromosomalen Lokalisation nichts bekannt (Strausberg *et al.*, 2002).

1.3.2 Die H-REV107 Familie ist Teil der NlpC/P60-Superfamilie

Durch Analyse der in Datenbanken gespeicherten DNA- und Aminosäuren Sequenzen, konnte Hughes *et al.* 2001 eine Verwandtschaft der 2A-Proteine aus Picorna-Viren mit den Proteinen der H-REV107 Familie zeigen (Hughes und Stanway, 2000). 2003 gelang es Anantharaman *et al.*, die H-REV107 Familie der NlpC/P60-Superfamilie zuzuordnen.

NlpC/P60 Proteine bilden eine Gruppe verschiedenster Proteine, die in vielen Bakterienstämmen vertreten sind. Darunter finden sich Zellwand-Peptidasen sowie Proteine unbekannter Funktion. Allen gemein ist eine katalytische Domäne mit einem N-terminalen, konservierten Cystein, gefolgt von einem C-terminalen, konservierten Histidin. Zwischen diesen befindet sich ein konservierter Bereich mit einem Glycin, dem oftmals eine Asparaginsäure folgt. Diese drei bzw. vier konservierten Aminosäuren bilden das für die NlpC/P60-Superfamilie charakteristische Motiv. Die NlpC/P60 Superfamilie wurde von Anantharaman & Aravind in vier Gruppen eingeteilt, die P60-ähnliche, die AcnB-ähnliche, die YaeF-ähnliche und die LRAT-ähnliche Familie (Anantharaman und Aravind, 2003).

Tabelle 1: Die H-REV107 Genfamilie wird auch als HRASLS Genfamilie bezeichnet. Insgesamt gehören fünf Gene zu der Familie, darunter *H-REV107-1*, das auch *HRASLS3* genannt wird. Mit Ausnahme von *HRASLS* sind alle Mitglieder der Genfamilie in der Region 11q12.3 lokalisiert.

Name	weitere Namen	Lokalisation des Gens	Größe des Proteins	Expression des Gens	Literatur
------	------------------	--------------------------	-----------------------	------------------------	-----------

	Namen	des Gens	(Aminosäuren)	Gens
<i>HRASLS</i> (HRAS-like suppressor)	<i>AC-1</i>	3q29	168	Gehirn, Herz, Testis, Akiyama et al., 1999 Skelettmuskel Ito et al., 2001
<i>HRASLS2</i>		11q12.3	162	mRNA experimentell bestätigt. Kodierende Sequenz als Computeranalyse vorhergesagt GeneID: 54979
<i>HRASLS3</i>	<i>H-REV107-1</i> <i>H-REV107-3</i>	11q12.3	162	Ubiquitär in epithelialem Gewebe Hajnal et al., 1994 Husmann et al., 1998
<i>RARRES3</i> (Retinoic acid receptor responder 3)	<i>RIG-1</i> <i>TIG-3</i> <i>H-REV107-2</i>	11q12.3	164	Ubiquitär, auch in Lymphozyten und Schilddrüse DiSepio et al., 1998
<i>HRLP5</i> (H-REV107-like protein 5)		11q12.3	279	mRNA experimentell bestätigt. Kodierende Sequenz als Computeranalyse vorhergesagt Strausberg et al., 2002

1.3.2.1 Die P60-ähnliche Familie

Die P60-ähnliche Gruppe besteht aus weit verbreiteten Proteinen verschiedener Bakterienstämme, bei denen es sich, soweit charakterisiert, ausschließlich um Peptidasen handelt. Alle Mitglieder dieser Familie haben entweder ein Signalpeptid oder besitzen eine transmembrane Region, woraus sich auf eine extrazelluläre Lokalisation der Proteine schließen lässt.

1.3.2.2 Die Acmb-ähnliche Familie

Die Acmb-ähnliche Familie ist die divergenteste Protein-Familie. Sie setzt sich aus den beiden großen Subfamilien Acmb und LytN zusammen, deren Vorkommen zum größten Teil auf Gram-positive Bakterienstämme begrenzt ist und deren Funktion sich auf Zellwand-Hydrolasen beschränkt. Die Architektur ihrer Domänen entspricht dabei oftmals derjenigen der Mitglieder der P60-ähnlichen Familie. Eine dritte Subfamilie kommt aus γ -Proteobakterien und Trypanosomen und wird durch die gemeinsame Amino-terminale Amidase-Domäne GSPS charakterisiert.

1.3.2.3 Die YaeF-ähnliche Familie

Die YaeF-ähnliche Familie besitzt, genauso wie die LRAT-ähnliche Familie, eine zirkuläre Permutation der, in den NlpC/P60 Proteinen vorhandenen, konservierten Aminosäuren (Abb. 1). Diese zirkuläre Permutation führt dazu, dass hier das konservierte Glycin am N-terminalen Ende liegt. Darauf folgt das konservierte Histidin und C-terminal liegt das konservierte Cystein. Gemeinsam mit den LRAT-Proteinen besitzen die Proteine der YaeF-ähnlichen Familie, C-terminal ein weiteres, konserviertes Cystein. Die YaeF-ähnliche Familie setzt sich aus

YaeF- und PoxvirusG6R-ähnlichen Mitgliedern zusammen, die in Bakterien, dem Archeon *Archaeoglobus*, in *C. elegans* und in Poxviren vorkommen (Anantharaman und Aravind, 2003).

1.3.2.4 Die LRAT-ähnliche Familie

Die Mitglieder der LRAT-ähnlichen Familie werden bisher hauptsächlich in Eukaryoten und tierischen Viren gefunden. Je ein Protein dieser Familie kommt auch im Proteom von *Vibrio cholera* und *Anabaena* vor. In Vertebraten existieren zwei weitere Subfamilien, zum einen die H-REV107 Familie, zum anderen die, durch das noch nicht charakterisierte, humane NSE2 Protein definierte, NSE-Familie. Die von diesen Proteinen am weitesten charakterisierte Lecithin Retinol Acyltransferase (LRAT) spielt in Vertebraten eine wichtige Rolle bei der Lagerung und der Bereitstellung von Retinol als Retinylester (Rando, 2002). Neben dem katalytischen Cystein der NCE-Domäne ist für die enzymatische Funktion des LRAT-Proteins auch das weiter C-terminal liegende Cystein essentiell. Mit H-REV107-1 verwandte Proteine wurden auch in Picorna-Viren wie dem humanen Parecho Virus, dem Aichi Virus und dem Encephalomyelitis Virus gefunden (Hughes und Stanway, 2000). Außerdem wurden dem H-REV107-1 verwandte Proteine in humanen Calici Viren, wie dem Norwalk Virus und seinen Verwandten, gefunden. Die Mitglieder der NSE-Familie haben gemein, dass bei ihnen das Cystein der NCE-Domäne durch ein Serin ersetzt worden ist. Eine biochemische Funktion ihrer Domänen ist nicht bekannt. NSE2 interagiert mit α -Catenin und zeigt ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau in Brusttumoren (Adam et al., 2003).

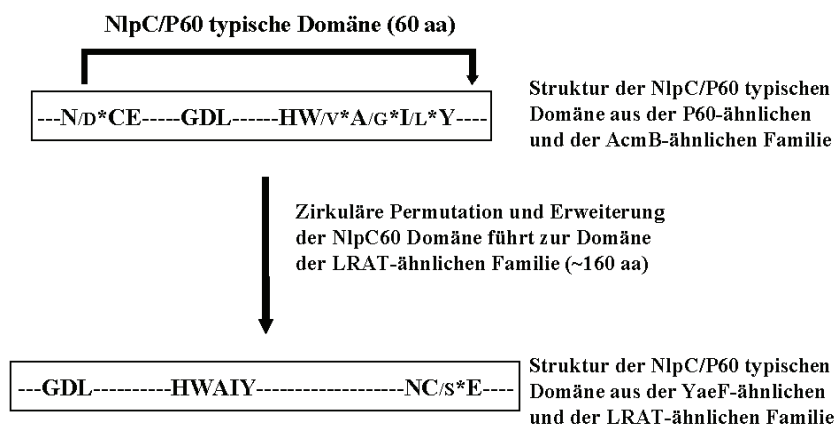


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zirkulären Permutation konservierter Aminosäuren in der YaeF- und LRAT-ähnlichen Familie

1.4 Die humane H-REV107 Proteinfamilie

Die engere H-REV107-ähnliche Proteinfamilie besteht aus den fünf Proteinen H-REV107-1 (HRASLS3), HRASLS2, AC-1 (HRASLS1), RARRES3 und HRLP5 und besitzt drei konservierte Domänen (Abb. 2). Vom N-terminalen zum C-terminalen Ende werden die Domänen als die GDL-, die HWAIIY- und die NCE-Domäne bezeichnet. Die Funktion der Domänen ist weitgehend unbekannt. Die einzige Ausnahme in Eukaryonten ist die NCE-Domäne. Bei dem verwandten Protein LRAT bildet das Cystein das katalytische Zentrum der NCE-

Domäne, das die Veresterung von Retinol zu Retinylester steuert. Zwischen der HWAIIY- und der NCE-Domäne befinden sich zwei weitere Domänen, die jeweils nur in einigen Mitgliedern der Familie konserviert sind. So folgt nach der HWAIIY-Domäne eine DXXG-Domäne, die sowohl in H-REV107-1 als auch in RARRES3 vorkommt, und darauf folgend eine NKXD-Domäne, die in H-REV107-1, in HRASLS2 und in HRLP5 konserviert ist. Diese zwei Domänen haben eine hohe Übereinstimmung mit zwei, in GPTasen konservierten, Regionen. Bisher konnte aber für kein Mitglied der H-REV107-Familie eine GTPase-Aktivität gezeigt werden. Am C-Terminus befindet sich eine lange, hydrophobe Sequenz, mit der die Proteine an intrazelluläre Membranen binden. Auch die Funktionen dieser weiteren Domänen sind in Eukaryonten bislang unklar (Nazarenko et al., 2004).

Tabelle 2: Die relativen Übereinstimmungen der Aminosäure-Sequenzen der H-REV107 Familie (Nazarenko et al., 2004). Zum Vergleich wurden alle nicht-redundanten GenBank CDS Einträge sowie Translationen und SwissProt Einträge herangezogen.

Protein	Übereinstimmung	Ähnlichkeit
H-REV107-1	100%	100%
HRASLS2	60%	82%
RARRES-3	51%	66%
HRLP5	51%	64%
HRASLS	46%	64%

		GDL	HWAIIY	
H-REV107-1	: 1	MRAPLPEPKPGDLIEIFRPFYR	HWAIIYVGDGYVVLHAP	PSEVAGA· 45
HRASLS2	: 1	MALARERPRIGDLIEISRFGYAH	HWAIIYVGDGYVVLHAP	ASEIAGA· 45
RARRES3	: 1	MASPHQEPKPGDLIEIFRLGYEH	HWAIIYVGDGYVVLHAP	PSEYPGA· 45
HRASLS	: 8	SLNYPGNPCPGDLIEVFRPGYQH	HWAIIYVGDGYVINIAP	PVDGI PAS· 52
HRLP-5	: 113	AAEGKPRPRPGDLIEIFRIGYEH	HWAIIYVEDDCVVLHAP	PSEEFV· 157

		DXXG	NKXD	
H-REV107-1	: 46	GAASVMSALTDKAIKKKELLYDVAG	SDKYQVNNKHDDKYSPLP	CS· 90
HRASLS2	: 46	GAASVLSALTNKAIKKKELLSVAG	GDNYRVNNKHDDRYTPLP	SN· 90
RARRES3	: 46	GSSSVFSVLSNSAEVKRGRLEDV	VGGCCYRVNNSLDHEYQPRP	VE· 90
HRASLS	: 53	FT-SAKSVFSSKALVKMQLLDV	VGNDTYRINNKYDETYPLP	VE· 96
HRLP-5	: 158	G--SITSIFSNRAVVKYSRLEDV	LHGCSWKVNNKLDGTYLPLP	VD· 200

		NCE	
H-REV107-1	: 91	KIIQRAEELVGQEVLYKLTSENCEHFVNELRYG	VARSDQVRDVII· 135
HRASLS2	: 91	KIVKRAEELVGQELPYSLTSDNCEHFVNHLRYG	VSRSDQVTGAVT 135
RARRES3	: 91	VLISSAKEMVGQKMKYSIVSRNCEHFVAQLRYG	KSRCKQVEKAKV 135
HRASLS	: 97	EIIKRSEFVIGQEVAYNLLVNNCEHFVTILRYG	EGVSEQANRAIS 141
HRLP-5	: 201	KIIQRTKKMVNKIVQYSLIEGNCEHFVNGLRYG	VPRSQQVEHALM 245

H-REV107-1	: 136	AASVAGMGLAAMSLIGVMFSRNKRQKQ· · ·	162
HRASLS2	: 136	TVGVAAGLLAAASLVGILLARSKRERQ· · ·	162
RARRES3	: 136	EVGVATALGILVVAGCSFAIRRYQKKATA·	164
HRASLS	: 142	TVEFVTAAGVVF SFLGLF PKGQRAKY· · ·	168
HRLP-5	: 246	EGAKAAGAVISAVVDSIKPKPITA· · · · ·	269

Abbildung 2: Der Vergleich der Proteinsequenzen der Mitglieder der H-REV107-Familie. Die fettgedruckten Buchstaben zeigen die in allen Familienmitgliedern konservierten Aminosäuren. Die grau hinterlegten Bereiche zeigen potentielle Domänen. Die Domänen sind mit ihrem jeweiligen Namen überschrieben (Nazarenko et al., 2004).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Expression des Klasse II Tumorsuppressorgens *H-REV107-1* wird in Tumorzellen reversibel supprimiert. Diese Suppression ist vermutlich essentiell, um eine maligne Transformation der Zellen zu ermöglichen. Für therapeutische Zwecke ist es daher wichtig, die Suppression des Gens aufheben zu können. Eine Voraussetzung dafür ist das Verständnis der Abhängigkeit der *H-REV107-1* Genexpression von den entsprechenden Transkriptionsfaktoren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, diese Regulations-Mechanismen zu finden. Dazu soll untersucht werden, von welchen Signalwegen die Transkription des *H-REV107-1* Gens abhängig ist. Des weiteren sollen die allgemeinen Mechanismen der H-REV107-1 Expression aufgeklärt, die funktionellen Regionen des Promoters analysiert sowie die, für die Regulation verantwortlichen, spezifischen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
PD98059	Alexis, 385-023-M10
LY294002	Alexis, 270-038-M005
Nogalamycin	Calbiochem, 488200
5-Aza-2'-Desoxycytidine	Sigma, A 3656
Trichostatin A	Sigma, T 8552
Cycloheximid	Calbiochem, 239764
IFN- γ Maus	PeptoTech, C-31505-H
IFN- γ Mensch	R&D Systems, #285-IF
TNF- α Maus	R&D Systems, #410-MT
TNF- α Mensch	R&D Systems, #210-TA
pCPT-cAMP	Sigma, C 3912

2.1.2 Kits

Name	Anwendung	Firma
RNeasy Mini	RNA Isolierung	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep	DNA Isolierung	Qiagen
QiaExII	DNA Isolierung aus Agarosegel	Qiagen
Fast-Link™ DNA Ligation and Screening	Ligation	Epicentre Technologies
Nick Translation	5'-Markierung von Oligonukleotiden	Amersham Pharmacia Biotech
Fugene™ Transfection Reagent	Transfektion	Boehringer Mannheim
SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequenzierung	Sequenzierung	Epicentre Technologies
GPST™-I Genome Priming System	Sequenzierung	New England Biolabs
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis	Zielgerichtete Mutagenese	Stratagene
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Reporter Assay	Promega

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Szintillationszähler	Wallac; Wallac 1409
Luminometer	Berthold Technologies; Lumat LB 9507

2.1.4 Enzyme

Name	Funktion	Firma
KpnI	Restriktionsenzym	Promega
SmaI	Restriktionsenzym	Promega
PvuI	Restriktionsenzym	Promega
PstI	Restriktionsenzym	Promega
EcoRI	Restriktionsenzym	Promega
SmaI	Restriktionsenzym	Promega
XhoI	Restriktionsenzym	Promega
HindIII	Restriktionsenzym	Promega
NotI	Restriktionsenzym	Promega
BamHI	Restriktionsenzym	Promega
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 Polynucleotid Kinase	T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs
Deep Vent™ (exo ⁻) DNA Polymerase	Polymerase	New England Biolabs
Vent™ DNA Polymerase	Polymerase	New England Biolabs
Taq Gold	Polymerase	Boehringer Mannheim
Superscript™ II RNase H ⁻	Reverse Transkriptase	Life Technologies
HK™ Thermolabile Phosphatase	Phosphatase	Epicentre Technologies
SssI Methylase	Methylase	New England Biolabs

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Medium	Typ	Referenz
OVCAR-3	D 10	humane Ovarialkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), USA
SKOV-3	D 10	humane Ovarialkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), USA
A27/80	D 10	humane Ovarialkarzinomzelllinie	European Cell Culture Collection (ECACC), UK
HOSE	D 10	humane Ovarial-Oberflächenepithelzelllinie	Tsao et al., 1995
RCC26 endo	D 10	Nierenkarzinomzelllinie	Jung et al., 1998
RCC26 exo	D 10 + G418 (700 µg/ml)	Derivat von RCC 26 endo erzeugt durch stabile Überexpression von INF-γ	Jung et al., 1998
OAW42	D 10	humane Ovarialkarzinomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), USA
PA-1	D 10	humane Teratokarzinomzelllinie	Zeuthen et al., 1980
NIH3T3	D 10	Maus Fibroblastenzelllinie	Todaro und Green, 1969
KA-1	D10 + G418 (70µg/ml) Hygromycin (14 µg/ml)	Derivat von NIH3T3 erzeugt durch stabile Überexpression von humanem Östrogen/IRF-1 Fusionsplasmid	Kirchhoff und Hauser, 1999
Rose199	D 10 + G 418	Ratten Ovarial-Oberflächenepithelzelllinie	Adams und Auersperg, 1985
Rose199 A2/5	D 10 + G 418	Derivat von ROSE199 erzeugt durch stabile Überexpression von KRAS (V12)	Tchernitsa et al., 2004

2.1.6 Bakterienstämme (Escherichia coli)

Name	Genotyp	Firma
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
XL2-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene
SURE 2	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10(Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene

2.1.7 Antikörper für den Gel Retardations-Assay

Name	Hersteller	Nummer	Spezifität für Spezies	Spezifität Proteine	für eingesetzte Verdünnung
cRel (C)	Santa Cruz	sc-71	Maus, Ratte	cRel (p75)	1:30
NFκB p65 (A)	Santa Cruz	sc-109	Mensch, Maus, Ratte	NFκB (p65)	1:30
cRel (N)	Santa Cruz	sc-70	Mensch, Maus, Ratte	cRel (p75)	1:30
NFκB p65	Cell Signalling	3032	Mensch, Maus, Ratte	p65, p50	1:30
NFκB p52	Upstate	05-361	Mensch	p52	1:30
NFκB p50	Upstate	06-886	Mensch, Maus	p50	1:30
RelB (C-19)	Santa Cruz	sc-226	Mensch, Maus, Ratte	RelB (p68)	1:30
cRel (N-466)	Santa Cruz	sc 272X	Mensch, Maus, Ratte	cRel (p75), NFκB (p65)	1:30
CREB-1 (C-21)	Santa Cruz	sc-186X	Mensch, Maus, Ratte	CREB-1 (p43), ATF-1, CREM-1	1:30
ATF-2 (N-96)	Santa Cruz	sc-6233X	Mensch, Maus, Ratte	ATF-2	1:30
ATF-3 (C-19)	Santa Cruz	sc-188X	Mensch, Maus, Ratte	ATF-3	1:30

2.1.8 Membranen

Name	Experiment	Hersteller
Hybond-N	Northern Blot	Amersham Biosciences
Hybond-N+	Northern Blot	Amersham Biosciences
Nytran N	Southern Blot	Schleicher & Schuell Biosciences

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 Primer für die Sequenzierung

Name	Sequenz	T _M
M13 fwd	CAG GAA ACA GCT ATG AC	57°C
M13 rev	GTA AAA CGA CGG CCA GT	57 °C
T3 fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	54 °C
T7 rev	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	60 °C
SEAP fwd seq	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	58 °C
SEAP rev seq	CCT CGG CTG CCT CGC GGT TCC	71 °C
pGL3 fwd seq	CTA GCA AAA TAG GCT GTC C	55 °C
pGL3 rev seq	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	59 °C
GPS-1 N	ACT TTA TTG TCA TAG TTT AGA TCT ATT TTG	57 °C
GPS-1 S	ATA ATC CTT AAA AAC TCC ATT TCC ACC CCT	63 °C

2.1.9.2 Primer zur Synthese der Fragmente der SEAP Konstrukte

Name	Kürzel	Orientierung	Sequenz kursiv: Restriktionsschnittstelle (RS) normal: Primersequenz	T _M in °C: mit RS/ ohne RS
Prom fwd Kpn1	H-Rev A	5'-3'	<i>GGGGTACCCC</i> GAG ACT GAG TTT CGC TTT G	66 / 49
Prom fwd2 Kpn1	H-Rev B	5'-3'	<i>GGGGTACCCC</i> ACA GGC TAG AGT GCA GTG	67 / 50
Prom fwd3 Kpn1	H-Rev C	5'-3'	<i>GGGGTACCCC</i> TCA TCG TGT TAG CCA GCA TG	67 / 52
Prom fwd4 Kpn1	H-Rev D	5'-3'	<i>GGGGTACCCC</i> AGA GGT CGA GTG TGT GC	67 / 49
Prom H-Rev rev EcoRI	2	3'-5'	<i>CGGAATTCCG</i> TGG ACC GGG TCT AAT GG	64 / 49
H-Rev107 rev EcoRI	5` 4	3'-5'	<i>CGGAATTCCG</i> ACC CTC AAG GCC AGG CTC	67 / 55

2.1.9.3 Primer zur Synthese der Fragmente der pGL3 Konstrukte

Name	Kürzel	Orientierung	Sequenz	T _M in °C:
			kursiv: Restriktionsschnittstelle (RS)	mit RS/
			normal: Primersequenz	ohne RS
Prom H-Rev fwd Kpn1	A	5'-3'	GGGGTACCCC GAG ACT GAG TTT CGC TTT G	66 / 49
Prom H-Rev fwd2 Kpn1	B	5'-3'	GGGGTACCCC ACA GGC TAG AGT GCA GTG	67 / 50
Prom H-Rev fwd3 Kpn1	C	5'-3'	GGGGTACCCC TCA TCG TGT TAG CCA GCA TG	67 / 52
Prom H-Rev fwd4 Kpn1	D	5'-3'	GGGGTACCCC AGA GGT CGA GTG TGT GC	67 / 49
Prom H-Rev fwd5 Kpn1	E	5'-3'	GGGGTACCCC TCT GCG AGG CTC TCA TTA G	67 / 51
Prom H-Rev fwd6 Kpn1	F	5'-3'	GGGGGTACCCC ACC CGG TCC AAT TGC TG	69 / 49
Prom H-Rev rev Sma1	2	3'-5'	TCCCCCGGGGGA TGG ACC GGG TCT AAT GG	72 / 51
Prom+STAT1 rev Sma1	3	3'-5'	TCCCCCGGGGGA AGA AGC ATC CCA GGC AC	70 / 49

2.1.9.4 Primer für die Sondenherstellung

humane H-REV107-1 Sonde (Northern- und Southern Blot Hybridisierungsassay)

Name	Sequenz	T _M
hu107-D	GCC TCC GAG ACC GAG AGT GG	65.5°C
hu107-E	CAT CTT CCT CGC GGT GTG GAC CC	68°C

Ratten H-rev107-1 Sonde (Northern Blot Hybridisierungsassay)

Name	Sequenz	T _M
R107-K	GAA GTT GAG CCT CAC ATA TCC TG	63°C
R107-D	TCG CCA CCT TGA CGG TAT CT	62°C

humane und Ratten IRF-1 Sonde (Northern Blot Hybridisierungsassay)

Name	Sequenz	TM
hu IRF-1 fwd	CTG GGA CAT CAA GGA TG	57°C
hu IRF-1 rev	GTA GCT GCT GTG GTC ATC AG	59.5°C

Primer Extension Assay

Name	Sequenz	TM
HRev107 PrimExt 2	GAA CAA CCA CCT CGC TCC CTT TAA CAA CTT TCT CG	71°C
HRev 107 seqrev 2	GAA CAA CCA CCT CGC TCC CTT TAA C	64°C

2.1.9.5 Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Transkriptions faktorbindungsstelle	Primer	T _M
IRF-1/IRF-2/ ISRE	Fwd: CATATATATATTTT <u>G</u> AGACTGAG <u>G</u> TT <u>C</u> GCTGTGTGCACAGGCTAG Rev: CTAGCCTGTGCAACAC <u>A</u> GCGAAC <u>C</u> TCAGTCTCAAAATATATATATG	79 °C
AP-4 + AP-1	Fwd: CATCGTGTTAGCAAGCATGGTCTCGATCTCTTAACTCGTGATCTG Rev: CAGATCACGAGGT <u>T</u> AAGAGATCGAGACCATGCT <u>T</u> GCTAACACGATG	72 °C
GC-Box	Fwd: CATTAGCCGGCGGCGCGG <u>C</u> GAC <u>G</u> AGCCGGGTGACCTCACGC Rev: GCGTGAGGTACCCGGCT <u>C</u> G <u>T</u> C <u>G</u> CCGCGCCCGGCTAATG	89 °C
CREB-1	Fwd: GAGGGGCCGGGTG <u>C</u> CCG <u>C</u> ACGCCGGCCCGCCAC Rev: GTGGCGGGCCGGCGTG <u>C</u> GGG <u>C</u> ACCCGGCCCCCTC	89 °C
CCAAT-Box #1.	Fwd: GCCCGCCACCGCGGCTATTAGACCCGGTC Rev: GACCGGGTCTAATAGCCGCGGTGGCGGGC	84 °C
CCAAT-Box #2.	Fwd: CATTAGACCCGGTCTAATTGCTGGGGCTGC Rev: GCAGCCCCAGCAATTAGACCGGGTCTAATG	79 °C
cRel-Box #1	Fwd: GCGAAGTGGGTGATCTGGTCTTCATGGAAGGTGCGATAAG Rev: CTTATCGCACCTTCCATGAAGACCAGATCCACCCACTTCGC	82 °C
cRel-Box #2	Fwd: GTCTTCCTGGAAGGTGAGATAAGCCGGGCGAG Rev: CTCGCCCGGCTTATCTCACCTTCCAGGAAGAC	83 °C
STAT	Fwd: GTGGGTGGATCGGGTCTGCCTGGCAGGTGCGATAAG Rev: CTTATCGCACCTGCCAGGCAGACCCGATCCACCCAC	83.5 °C

Die unterstrichenen Basen zeigen die eingeführten Mutationen.

2.1.9.6 Oligonukleotide für EMSA Experimente

Name	Sequenz	Quelle
CREB (H-REV107-1)	GAG GGG CCG GGT GAC CTC ACG CCG GCC CGC CAC	aus der <i>H-REV107-1</i> Promotersequenz
CREB mutiert (H-REV107-1)	GAG GGG CCG GGT GCC CGC ACG CCG GCC CGC CAC	aus der <i>H-REV107-1</i> Promotersequenz
CREB Literatur	AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG	Konsensus CRE Sequenz Zhang et al., 2004
cRel (H-REV107-1)	GTG GAT CGG GTC TTC CTG GAA GGT GCG ATA AG	aus der <i>H-REV107-1</i> Promotersequenz
cRel mutiert (H-REV107-1)	GTG GAT CTG GTC TTC ATG GAA GGT GCG ATA AG	aus der <i>H-REV107-1</i> Promotersequenz
NFκB Literatur	GAT GAC ACC TGG GGA ATT CCC ACA CGG AGC AGG	aus dem <i>Toll-like receptor 2</i> Promoter; Wang et al., 2001
STATα Literatur	TAC TTT CAG TTT CAT ATT ACT CTA	Konsensus STATα Sequenz De Saint et al., 2000
STAT1 / STAT3 Literatur	CGT CGA CAT TTC CCG TAA ATC A	aus dem <i>c-fos</i> Promoter Ward et al., 1999
STAT1 / STAT 5 Literatur	AGA TTT CTA GGA ATT CAA TCC	aus dem <i>β-casein</i> Promoter; Ward et al., 1999

2.1.10 Plasmide, Konstrukte und Phagen

Name	Vektor-Backbone	Art	Bezugsquelle	Verwendung
Bluescript II KS +	pUC19	Klonierungsvektor	Stratagene	Klonierung
P-1 bis P-12	pCYPAC-2	Phagen mit Teilen des humanen Genoms	Ressourcen-Zentrum Heidelberg (RZPD)	Subklonierung
IRF1-hER	pMTHE	Expressionsplasmid	S. Kirchhoff, H. Hauser; EUGEN	Expressionsanalyse
phRG-TK	pGL3 basic	Expressionsplasmid	Promega	Promoterassay
SEAPII basic	SEAPII basic	promoterloses Expressionsplasmid	Clontech	Promoterassay
A-2	SEAPII basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.5	Promoterassay
B-2	SEAPII basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.5	Promoterassay
C-2	SEAPII basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.5	Promoterassay
D-2	SEAPII basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.5	Promoterassay
A-4	SEAPII basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.5	Promoterassay
pGL3 basic	pGL3 basic	promoterloses Expressionsplasmid	Promega	Promoterassay
A-1	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
A-2	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
A-3	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
B-3	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
C-3	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
D-3	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
E-3	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
F-3	pGL3 basic	Expressionsplasmid	siehe Kapitel 2.2.7.4	Promoterassay
I-Kappa (S32A/S36A) dom. negativ	B pUSEamp+	Expressionsplasmid	Upstate Cell Signaling	Promoterassay

2.1.11 Software

2.1.11.1 Promoteranalyse

Programm	URL
Genomatix MatInspector	http://www.genomatix.de
Genomatix PromoterInspector	http://www.genomatix.de
ConPro	http://stateslab.bioinformatics.med.umich.edu/conpro
McPromoter	http://genes.mich.edu/McPromoter.html
FirstEF	http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF
CPGPLOT	http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/

2.1.11.2 Datenbanken

Datenbank	URL
Database TSS oligo-capped	http://dbtss.hgc.jp/index.html
BLAST (NCBI) non-redundant (nr)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAST (NCBI) high throughput genome sequences (htgs)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

2.1.12 Stammlösungen

10 × PBS Puffer [pH 7.4]	80 g NaCl
	2 g KCl
	14.4 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
	2.4 g KH ₂ PO ₄
	H ₂ O auf 1 Liter
5× TAE-Puffer [pH 7.5 – 7.8]	24.2 g Tris-Base
	5.7 ml Eisessig
	10 ml 0.5 M EDTA [pH 8.0]

	H ₂ O auf 1 Liter
10 × MOPS Puffer [pH 7.0]	41.8 g MOPS
	4.1 g Na-Acetat
	20 ml 0.5 M EDTA [pH 8.0]
	H ₂ O auf 1 Liter
20 × SSC [pH 7.0]	175.3 g NaCl
	88.2 g Na-Citrat
	H ₂ O auf 1 Liter
1 × TA-Puffer	4,8 g Tris-Base
	1.1 ml Eisessig
	6,5 g Kaliumacetat
	2,1 g Magnesiumacetat
	0.08 g DTT
	H ₂ O auf 1 Liter
	mit 5 N NaOH auf pH 7.8 einstellen
10 × TBE-Puffer	108 g Tris-Base
	55 g Borsäure
	20 ml 1 M EDTA [pH 8.0]
	H ₂ O auf 1 Liter
DNA-Lade-Puffer	0.25 % Bromphenolblau
	0.25 % Xylencyanol
	30 % Glycerin
RNA-Lade-Puffer	0.35 ml H ₂ O

	0.21 ml 10 × MOPS
	0.35 ml 37% Formaldehyd
	0.96 ml deionis. Formamid
	0.1 ml Glycerol
	0.01 g Bromphenol-Blau
	2 µl Ethidiumbromid
2 × UB-Puffer	2.4 g HEPES
	0.4 g MgCl ₂
	0.32 g DTT
	7.5 g NaCl
	100 ml Glycerol
	H ₂ O auf 1 Liter, auf pH 7.8 einstellen

2.1.13 Medien

2.1.13.1 Zellkultur

D10

Ausgangsmedium

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)

Cambrex, Verviers, Belgien)

enthält 1 g/L Glucose, kein L-Glutamine

Zusätze

50 ml fötales Kälberserum

5 ml Streptomycin/Penicillin

5 ml L-Glutamin

Für Östrogen-freies Medium (KA-1 Zellen) wurde fötales Kälberserum der Firma Boehringer Mannheim (Katalog-Nr.: 210 471) verwendet.

2.1.13.2 Bakterienkultur

1 × LB-Agar

15 g Agar

10 g NaCl

10 g Tryptone

	5 g Hefe-Extrakt
	H ₂ O auf 1 Liter
	mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen
	autoklavieren
1 × LB-Medium	10 g NaCl
	10 g Tryptone
	5 g Hefe-Extrakt
	H ₂ O auf 1 Liter
	mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen
	autoklavieren
2 × YT-Medium	16 g Tryptone
	10 g NaCl
	10 g Hefe Extrakt
	H ₂ O auf 1 Liter
	mit 5 N NaOH auf pH 7.2 – 7.4 einstellen
	autoklavieren
1 × NYZ ⁺ -Medium	10 g NZ Amin (Casein Hydrolysat)
	5 g Hefe-Extrakt
	5 g NaCl
	H ₂ O auf 1 Liter
	mit 5 N NaOH auf pH 7.5 einstellen
	autoklavieren
vor dem Gebrauch noch zugeben	12.5 ml 1 M MgCl ₂ (steril)
	12.5 ml 1 M MgSO ₄ (steril)
	10 ml 2 M filtersterilisierte Glukose-Lösung

2.1.14 Gel-Zusammensetzung

1%iges DNA-Agarosegel	0.5 g Agarose
	50 ml 1 × TAE-Puffer
	0.2 µl Ethidiumbromid
0.8%iges RNA-Agarosegel	1.6 g Agarose
	20 ml 10 × MOPS-Puffer
	0.8 µl Ethidiumbromid
	10.8 ml 37% Formaldehyd
	146 ml H ₂ O
8%iges Polyacrylamid Gel	31.5 g Harnstoff
	in 61 ml H ₂ O lösen
	7.5 ml 10 × TBE
	6 ml Acrylamid (9:1)
	63 µl TEMED
	450 µl 10%iges APS

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung aus Säuger-Zelllinien

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy Kit von Qiagen benutzt. Die entsprechenden Zellen wurden in Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) kultiviert, das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (1x) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit RLT-Puffer abgelöst, in ein Mikrozentrifugationsröhrchen überführt und kurz mit dem Vortex resuspendiert. Zur Homogenisierung der Probe wurde diese mindestens fünfmal durch eine Kanüle (Durchmesser: 0.9 mm) gezogen. Ein Volumenäquivalent 70%igen Ethanol wurde zugegeben und gut gemischt. Die Probe wurde auf eine RNeasy Säule gegeben und für 15 Sekunden bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Die Probe wurde auf der Säule mit dem Puffer RW1 und anschließend zweimal mit dem Puffer RPE gewaschen. Zuletzt wurde die RNA mit 50 μ l RNase freiem Wasser eluiert (1 Minute bei $8000 \times g$). Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 DNA Isolierung

2.2.2.1 *Maxi Präparation*

100 ml Bakterienkultur wurden 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6.7 ml Maxiprep Puffer (25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM Glucose, 10 mM EDTA [pH 8.0]) und 100 μ g RNaseA/ml Lösung gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden der Lösung 13.3 ml 0.2 N NaOH und 1% SDS (Endkonzentration) zugegeben. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden 10 ml 3M Kaliumacetat zugegeben, gemischt und 20 min bei 4°C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde bei 4°C , für 20 min bei $9000 \times g$ abzentrifugiert, die wässrige Phase entnommen und das restliche Präzipitat abfiltriert. Ein Volumenäquivalent bestehend aus einem Gemisch von Tris-gesättigtem Phenol, Chloroform, Isopropanol im Verhältnis 25/24/1 wurde mit der Lösung vermischt und anschließend die Phasen bei 17°C für 10 min bei $16000 \times g$ getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Volumenäquivalent eines 49/1 Gemisches aus Chloroform und Isopropanol gemischt und für 10 min bei 17°C und $16000 \times g$ abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und 3 M NaCl im Verhältnis 1/10 sowie das 0.7fache Volumenäquivalent Isopropanol zugegeben. Das Gemisch wurde bei $16000 \times g$ und 4°C für 25 min abzentrifugiert, der wässrige Überstand abgegossen, das feste Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen und in Tris-HCl [pH8.0] aufgenommen. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.2.2 Mini Präparation

Kleinere Mengen DNA (-10µg) wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Dazu wurden 1.5 ml Bakterienkultur abzentrifugiert, das Pellet in 250 µl Puffer P1 gelöst und in ein Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde das Mikrozentrifugationsröhrchen dreimal geschüttelt und anschließend 350 µl Puffer N3 zugegeben. Das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Überstand auf eine QIAprep Säule gegeben. Diese wurde anschließend mit den Puffern PB und PE gewaschen. Zuletzt wurde die DNA mit 10 mM Tris-HCl [pH 8.0] von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Manipulation von DNA

2.2.3.1 Verdau von DNA

Soweit nicht anders angegeben, wurden zur Restriktion von DNA Enzyme der Firma Promega nach Anleitung des Herstellers verwendet und die DNA mit dem entsprechenden Enzym für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend den Angaben entsprechend inaktiviert. Die DNA der Phagen wurde auf Grund ihrer Größe über einen Zeitraum von 12 Stunden verdaut.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die linearisierte DNA wurde in 1×TA Puffer und 5 mM CaCl für 5 Minuten bei 30 °C inkubiert. Für jedes Mikrogramm DNA wurde eine Einheit des Enzyms HK Phosphatase (Epicentre Technologies) zugegeben und das Gemisch für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Abschließend wurde die Phosphatase durch Inkubation bei 65 °C und 15 Minuten inaktiviert.

2.2.3.3 Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde das Fast-Link DNA Ligation and Screening Kit (Epicentre Technologies) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dazu wurden 1.5 µl 10fach Puffer, 1mM ATP sowie Fragment-DNA und dephosphorylierte Vektor-DNA im molaren Verhältnis 3:1 (Gesamt-Menge: ca. 50 ng) gemischt. Hierzu wurden zwei Einheiten Fast-Link Ligase zugegeben. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 15 Minuten bei 70°C inkubiert.

Parallel dazu wurde eine Probe des nicht dephosphorylierten Leervektors zur Kontrolle ligiert. Ein kleiner Teil der Proben wurde mit einem Restriktionsenzym linearisiert und zur Kontrolle auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Aus dem Vergleich der Banden konnte abgelesen werden, ob das Fragment mit dem Vektor ligiert worden war. Das Restriktionsprodukt des Vektors, in den das Fragment ligiert wurde, sollte entsprechend des Fragments größer sein, als der zur Kontrolle linearisierte Leervektor.

2.2.3.4 Einführung von Punkt-Mutationen

Gezielte Mutationen wurden mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene), nach Anleitung des Herstellers, in Plasmid-DNA eingeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden in den Transkriptionsfaktorbindungsstellen des H-REV107-1 Promoters gezielt Nukleotide ausgetauscht.

Die Beschreibung der Methode in Kürze: Ein ca. 30 Basenpaare langes, komplementäres Primerpaar mit den gewünschten, in die Plasmid DNA einzuführenden Mutationen, wurde mit der Plasmid-DNA, dNTPs, und der *Pfu Turbo* DNA Polymerase in einer PCR Reaktion eingesetzt.

Tabelle 3: PCR-Programm zum Einbringen zielgerichteter Mutationen

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 Sekunden
		95 °C	30 Sekunden
2	12	55 °C	1 Minute
		68 °C	10 Minuten

In dieser Reaktion wurde die DNA mit der eingeführten Mutation synthetisiert. Die neu synthetisierte DNA enthält im Unterschied zur Ausgangs-DNA einen Knick. Dem auf 37 °C abgekühlten Reaktionsgemisch wurden 10 Einheiten des Restriktionsenzym DpnI zugegeben, welches nur die Ausgangs-DNA, aber nicht die neu synthetisierte DNA verdaut. Der Verdau fand bei 37 °C für eine Stunde statt. Die übriggebliebene, mutierte DNA wurde in XL1-Blue Supercompetente Zellen transformiert. In den Bakterien wurde der Knick von diesen repariert und die DNA vervielfältigt. Abschließend wurde die DNA mit Hilfe der DNA-Maxipräparation gewonnen und zur Kontrolle sequenziert.

2.2.4 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Die 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden wurde mit dem Nick Translation Kit von AmershamPharmacia Biotech, entsprechend dem Protokoll, durchgeführt. Dazu wurden 100 ng Oligonukleotid, 10 µl Nukleotid-Puffer und 5 µl dCTP [α -³²P] (10mCi/ml) mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 5 µl Enzym-Lösung zugegeben, gemixt, kurz abzentrifugiert und für 2 Stunden bei 15 °C inkubiert. Ein µl der Probe wurde in ein leeres Röhrchen gefüllt und die α -³²P-Einbaurate mit einem Szintillationszähler gemessen. Die restliche Probe wurde für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und die gewünschte Menge verwendet.

2.2.5 Northern Blot Hybridisierung für mRNA

Zehn µg Gesamt-RNA, gemischt mit 2µl RNA-Ladepuffer, wurden mittels Elektrophorese in einem formaldehydhaltigen, einprozentigem Agarosegel aufgetrennt (Elektrolytlösung: 1fach MOPS). Das Gel wurde auf einen UV-Tisch gelegt, fotografiert und zurechtgeschnitten. Anschließend wurde es für 10min in 5×SSC equilibriert. Das Gel wurde mit der Rückseite nach oben auf einen Bogen Whatmanpapier gelegt, dessen Enden in eine Lösung von 20×SSC hingen. Eine in 2×SSC equilibrierte Nylonmembran (HybondN) wurde auf das Gel gelegt, mit vier Lagen Whatmanpapier belegt und mit genügend saugfähigem Zellulosepapier bedeckt. Es wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Gel und der Nylonmembran keine Luftblasen befanden. Durch die aus dem Gel aufsteigende Flüssigkeit wurde die RNA im Laufe von 16 Stunden auf die Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde anschließend für 10 Minuten in 2×SSC gewaschen und die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (2 Minuten, 120mJ/cm²) fixiert. Die Membran wurde in Prähybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech), der 10 µl (10mg/ml) tRNA /ml ExpressHyb zugegeben war, bei 42 °C für mindestens 30 Minuten inkubiert. Eine markierte Sonde (Herstellung der Sonde siehe Kapitel 2.2.7) wurde für 2 Minuten bei 95°C denaturiert, der Hybridisierungslösung zugegeben und die Membran für weitere 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 2×SSC mit 0.1% SDS bei Raumtemperatur bei wiederholtem Austausch der Waschlösung für 30 Minuten gewaschen. Danach wurde die Membran in 0.1×SSC mit 0.1% SDS für eine Stunde bei 50 °C gewaschen. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt, in einer Dunkelkammer in eine Filmkassette auf einen Röntgenfilm (BioMAX MS) gelegt und über Nacht bei -70°C exponiert.

2.2.6 Southern Blot Hybridisierung für DNA

Die isolierte und gereinigte DNA eines Phagen, wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Die DNA wurde in einem einprozentigem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer 1×TAE). Das Gel wurde auf einen UV-Tisch gelegt, fotografiert und zurechtgeschnitten. Anschließend wurde es für 2 × 20 min in einer Lösung aus 0.4 M NaOH, 1 M NaCl equilibriert und die DNA denaturiert. Das Gel wurde mit der Rückseite nach oben auf einen Bogen Whatmanpapier gelegt, dessen Enden in eine Lösung von 0.4 M NaOH, 1 M NaCl hingen. Eine Nylonmembran (HybondN+) wurde auf das Gel gelegt, mit vier Lagen Whatmanpapier belegt und mit genügend saugfähigem Zellulosepapier bedeckt. Es wurde darauf geachtet, dass sich zwischen dem Gel und der Nylonmembran keine Luftblasen befanden. Durch die aus dem Gel aufsteigende Flüssigkeit wurde die DNA im Laufe von 16 Stunden auf die Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde anschließend in einer Lösung, bestehend aus 0.5 M Tris-HCl [pH 7.2] und 1.0M NaCl für 2 × 20 Minuten neutralisiert und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (2 Minuten, 120mJ/cm²) fixiert. Die Membran wurde in Prähybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech), der 10 µl (10mg/ml) tRNA /ml ExpressHyb zugegeben war, bei 60 °C für mindestens 30 Minuten inkubiert. Ein radioaktiv markiertes, PCR-synthetisiertes *H-REV107-1* cDNA Fragment, welches das 5'-Ende des Gens enthielt, wurde für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert, der Hybridisierungslösung zugegeben und die Membran für weitere 4 Stunden bei 60°C inkubiert (Herstellung der Sonde siehe Kapitel 2.2.7). Anschließend wurde die Membran in 2×SSC mit 0.1% SDS bei Raumtemperatur bei wiederholtem Austausch der Waschlösung für 30 Minuten gewaschen. Danach wurde die Membran in 0.1×SSC mit 0.1% SDS für eine Stunde bei 50 °C gewaschen. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt, in einer

Dunkelkammer in eine Filmkassette auf einen Röntgenfilm (BioMAX MS) gelegt und über Nacht bei -70°C exponiert.

2.2.7 PCR

2.2.7.1 Herstellung der humanen H-REV107-1 Sonde für den Northern- und Southern Blot Hybridisierungsassay

Sequenz der Primer: siehe Tabelle 2.1.9.4

Primer: 5'-3': hu107-D

3'-5': hu107-E

Ausgangs-DNA: 15 ng H-REV107-1 12-1cDNA pZERO-1

Primer je 15 pmol

Polymerase Taq Gold, 0.7 µl

dNTP 1 µl

Programm:

Tabelle 4: PCR-Programm zur Synthese der humanen H-REV107-1 Sonde

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	1	95	12 min
		95	20 sek
2	30	62	20 sek
		72	40 sek
3	1	72	5 min

2.2.7.2 Herstellung der IRF-1 Sonde für den Northern Blot Hybridisierungsassay (human und Ratte)

Sequenz der Primer: siehe Tabelle 2.1.9.4	Primer	je 20 pmol
Primer: 5'-3': hu IRF-1 fwd	Polymerase	Taq Gold, 0.7 µl
3'-5': hu IRF-1 rev	dNTP	1.0 µl
Ausgangs-DNA: 20 ng hER/IRF-1-Fusionsplasmid		
Programm:		

Tabelle 5: PCR-Programm zur Synthese der IRF-1 Sonde

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	1	95	12 min
		95	30 sek
2	30	55.5	30 sek
		72	60 sek
3	1	72	5 min

2.2.7.3 Herstellung der Ratten H-rev107-1 Sonde für den Northern Blot Hybridisierungsassay

Sequenz der Primer: siehe Tabelle 2.1.9.4	Primer	je 15 pmol
Primer: 5'-3': R107-K	Polymerase	Taq Gold, 0.7 µl
3'-5': R107-D	dNTP	1 µl
Ausgangs-DNA: pBS107-KS in Bluescript KS+ (Hajnal <i>et al.</i> , 1994)		
Programm:		

Tabelle 6: PCR-Programm zur Synthese der Ratten H-rev107-1 Sonde

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	1	95	12 min
		95	20 sek
2	30	60	20 sek
		72	40 sek
3	1	72	5 min

2.2.7.4 Herstellung der pGL3-Promoterkonstrukte

Tabelle 7: Annealing Temperaturen und Anzahl der Zyklen für die folgenden PCR Programme zur Synthese der pGL3-Konstrukte

Name des Fragments	Annealing Temp. °C (Schritt 2/Schritt 3)	Anzahl Zyklen (Schritt 2/Schritt 3)
A-3	49.5 / 64.5	10 / 25
B-3	49.5 / 64.5	10 / 25
C-3	49.5 / 64.5	10 / 25
D-3	49.5 / 64.5	10 / 25
E-3	48.5 / 68.5	10 / 25
F-3	48.5 / 68.5	10 / 25
A-2	50 / 66.5	10 / 25

PCR Programm für alle pGL3-Konstrukte:

Ausgangs-DNA: 20 ng, SEAP A-4

Primer je 30 pmol; Sequenz der Primer: siehe Tabelle 2.1.9.3

Polymerase Vent_R (New England Biolabs) 2 Units

dNTP 2 µl

Tabelle 8: PCR-Programme zur Synthese der pGL3-Konstrukte

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	1	95	10
2	siehe Tabelle 5	95	1
		siehe Tabelle 5	1
		78	2
3	siehe Tabelle 5	95	1
		siehe Tabelle 5	1
		78	2
4	1	78	10

2.2.7.5 Herstellung der SEAP-Promoterkonstrukte

Tabelle 9: Annealing Temperaturen und Anzahl der Zyklen für die folgenden PCR-Programme zur Synthese der SEAP-Konstrukte

Name des Fragments	Annealing Temp. °C (Schritt 2/Schritt 3)	Anzahl Zyklen (Schritt 2/Schritt 3)
A-2	48.7 / 65.5	10 / 20
B-2	48.7 / 65	10 / 25
C-2	48.7 / 65	10 / 25
D-2	48.7 / 65	10 / 20
A-4	48.5 / 63	10 / 20

Die Promoterkonstrukte für die funktionelle Untersuchungen, B-2, C-2, D-2 und A-2 wurden mittels PCR aus dem Gesamtpromoterfragment A-4 hergestellt.

PCR Programm für Konstrukte A-2 und A-4:

Ausgangs-DNA: 32 µg, Phage P1-8

Primer je 15 pmol; Sequenz der Primer: siehe Tabelle 2.1.9.2

Polymerase Vent_R (New England Biolabs) 1 Unit

dNTP 2 µl

Tabelle 10: PCR-Programme zur Synthese der SEAP-Konstrukte A-2 und A-4

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	1	95	10
2	siehe Tabelle 7	95	1
		siehe Tabelle 7	2
		78	6
3	siehe Tabelle 7	95	1
		siehe Tabelle 7	2
		78	6
4	1	78	10

PCR Programm für die Konstrukte B-2, C-2 und D-2:

Ausgangs-DNA: 20 ng, A-4

Primer je 30 pmol; Sequenz der Primer: siehe Tabelle 2.1.9.2

Polymerase Vent_R (New England Biolabs) 2 Units

dNTP 2 µl

Tabelle 11: PCR-Programme zur Synthese der SEAP-Konstrukte B-2, C-2 und D-2

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	1	95	10
2	siehe Tabelle 7	95	1
		siehe Tabelle 7	1
		78	3
		95	1
3	siehe Tabelle 7	siehe Tabelle 7	1
		78	3
		95	1
4	1	78	10

2.2.8 Sequenzierung

2.2.8.1 Genome Priming System

Um eine längere DNA Sequenz zu sequenzieren konnte man anstatt des "Primer-Walkings" auch das Genome Priming System verwenden. Bei diesem System wurden mit Hilfe eines, vom Transposon Tn7 abgeleiteten Transprimer™ Elements, in jedes Zielploid zwei Primer-Bindungsstellen (Primer N und S; Sequenz siehe Kapitel 2.1.9.1) statistisch zufällig verteilt in die Plasmid-DNA inseriert.

Durch Sequenzierung einer genügend hohen Anzahl an Klonen, ausgehend jeweils von den inserierten Primer-Bindungsstellen, erhält man eine vollständige Abdeckung der Ziel-DNA. Die Zusammensetzung der einzelnen, sich überlappenden Fragmente, erfolgt mit Hilfe eines Computers.

Zu einem Gemisch aus Ziel-DNA (0.08 µg) und zu inserierendem Transprimer™ (0.02 µg) wurde Transposase TnsABC zugegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe eines Startmixes lief die Reaktion für eine Stunde bei 37 °C und wurde abschließend 10 Minuten bei 75 °C inaktiviert.

Die DNA wurde in Bakterien transformiert und Klone durch Zugabe entsprechender Antibiotika selektioniert. Aus 50 Klonen wurde die transformierte DNA isoliert und anschließend mit dem Primer N und dem Primer S sequenziert.

2.2.8.2 zyklische Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit dem SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies) durchgeführt. Die Primer (siehe Kapitel 2.1.9.1) waren IRD 800 markiert und wurden von MWG Biotech bezogen. Aus einem frisch hergestellten Mix, bestehend aus 7.2 µl 3.5×SequiTherm EXCEL II Sequenzier-Puffer, 2 pmol markiertem Primer, 700 ng DNA, 1 µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase, der mit H₂O auf 17 µl aufgefüllt wurde, wurden je 4 µl entnommen und zu je 2 µl SequiTherm EXCEL II Termination Mix A, C, G oder T gegeben. Das Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend eine PCR mit folgenden Parametern durchgeführt:

Tabelle 12: PCR-Programm zur Durchführung von Sequenzierungen

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	30	95	30 sek
		T _M – 2 °C	15 sek
		(T _M s. Kapitel 2.1.9.1)	
		70	1 min

Abschließend wurden 3 µl Stop/Loading Puffer zugegeben.

Zur Analyse der Sequenzierung wurden die Proben für 3 Minuten auf 70 °C erwärmt und je 1.2 µl der Probe auf ein Sequenziergel aufgetragen. Das Sequenziergel wurde aus 350 µl 10% APS, 400 µl DMSO, 30 ml Sequagel XR und 7.5 ml Sequagel Complete Buffer (beides National Diagnostics) hergestellt. Die Analyse erfolgte mit dem Sequenzierautomat LI-COR DNA-Sequencer 4000 und wurde mit der Software DataBase Image IR am Computer ausgewertet.

2.2.9 Primer Extension

2.2.9.1 Markieren des Primers

Das Oligonukleotid HRev107 PrimExt 2 wurde mit ATP [γ -³²P] (10 mCi/ml) am 5'-Ende markiert. Dazu wurden 50 pmol Primer mit 2 Einheiten Polynukleotid-Kinase (PNK; NEB), 5 µl 10 × PNK-Puffer, 2 µl ATP [γ -³²P] und 36 µl H₂O für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die PNK anschließend für 15 min bei 70°C inaktiviert. Freies ATP [γ -³²P] wurde über eine Sephadex-Säule (G 25, Calbiochem) vom Primer abgetrennt und dieser anschließend mit 10 mM Tris-HCl [pH 8.0] von der Säule gewaschen. Zum Bestimmen der Einbaurate wurden die γ -Zerfälle pro Sekunde mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen. Die Konzentration des Primers wurde auf 10⁵ Zerfälle pro Sekunde je µl verdünnt und für jede Probe eine Menge des Primers eingesetzt, die 2×10⁴ Zerfälle pro Sekunde entsprach.

Um kleine Abweichungen beim Pipettieren der Proben, die zu stark unterschiedlichen Signalen auf dem Röntgenfilm geführt hätten, zu vermeiden, wurden alle Ansätze für 10 Proben oder mehr angesetzt. Im Ansatz für 1 Probe wurde Primer entsprechend einer Menge von 2×10^4 Zerfälle/s und 30 µg Gesamt-RNA mit H₂O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Probe wurde mit NaAcetat/EtOH gefällt und die getrocknete Probe in 30 µl Hybridisierungspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.9]; 1 mM EDTA; 250 mM KCl) aufgenommen. Das Gemisch wurde für 10 min auf 80°C erwärmt und über Nacht bei 30°C stehen gelassen. Die Probe wurde erneut gefällt und anschließend eine Reverse Transkription mit der Transkriptase SuperscriptII (Life Technologies) durchgeführt. Das Pellet wurde hierfür in 4 µl 5× RT-Puffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl RNAsin und 11.5 µl H₂O gelöst und für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Jetzt wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und die Probe für 10 Minuten bei 37 °C, 50 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Das fertige Produkt wurde mit 40 ng RNAaseA behandelt und die Behandlung mit 1 µl EDTA (0.5 M, [ph 8.0]) gestoppt. Die Probe wurde wieder mit NaAcetat/EtOH gefällt und in 4 µl 10 mM Tris-HCl [pH 8.0] aufgenommen.

2.2.9.2 radioaktive Sequenzierung im Zuge des Primer Extension Nachweises

Der Primer für die Sequenzierung wurde entsprechend dem "Nick Translation" Protokoll mit ATP [γ -³²P] (10 mCi/ml) und Polynukleotid Kinase am 5'-Ende markiert (s. Kapitel 2.2.4) und gemäss dem Protokoll der SequiTherm EXEL II Sequenzierung (s. Kapitel 2.2.8.2) eingesetzt.

Primer:	HRev 107 seqrev 2	2 pmol
Template:	H-REV107-1 12-1 in pZero	0.5 µg
Polymerase:	SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase	1 µl

Durchführung siehe Sequenzierung

Tabelle 13: PCR-Programm zur Durchführung der radioaktiven Sequenzierung

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	1	95	10 min
		95	1 min
		57	1 min
		72	2 min
3	1	4	∞

Das Produkt der Primer Extension Reaktion wurde neben dem Produkt der Sequenzierung auf einem 8%igen Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff) aufgetragen und bei 250V aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 2 Minuten auf 72 °C erwärmt und jeweils 2 µl Loading-Buffer zugegeben. Die Spannungsquelle wurde abgeschaltet, wenn die Bromphenol-Bande ca. 2 cm über dem Gelende stand. Das Gel wurde anschließend auf Whatmanpapier überführt, für zwei Stunden bei 70 °C vakuumgetrocknet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht zusammen mit einem Röntgenfilm bei –70°C in eine Filmkassette gelegt. Der entwickelte Film wurde von Hand ausgewertet.

2.2.10 Bakterienkultur

2.2.10.1 *allgemeine Bakterienkultur*

Bakterienkulturen auf festem Medium: Agar-Agar enthaltene LB-Medium wurde aufgeköcht und auf 50 °C abgekühlt. Jetzt wurde das gewünschte Antibiotikum zugegeben (Ampicillin, Kanamycin; jeweils mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml) und das Medium in 10 cm Petrischalen gegossen. Auf dem ausgehärteten Medium wurde die Bakterienkultur ausgestrichen und für 14 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden bis zu zwei Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

Bakterienkulturen in Flüssigmedium: LB-Medium wurde mit Ampicillin versetzt (Endkonzentration: 50 µg/ml) und je 2 ml auf 14 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. In dieses Medium wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze eine, von einer Agarplatte abgenommene Bakterienkolonie oder eine bei –80°C in Gefriermedium eingefrorene Bakterienkultur eingebracht und für 14 Stunden bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 220 Umdrehungen in der Minute inkubiert.

Phagen (Vektor pPAC4): Zur Kultivierung der Phagen-Klone wurde das Medium 2×YT benutzt und mit Kanamycin versetzt (Endkonzentration: 50 µg/ml). Je 200 ml des Mediums wurden aus einem, bei –80°C in Gefriermedium aufbewahrten, Phagenlysat angeimpft und für 14 Stunden bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 220 Umdrehungen in der Minute inkubiert.

2.2.10.2 *Transformation*

E.coli XL-2 Blue Ultracompetente Zellen oder E.coli Sure-2 Zellen (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und pro Ansatz 100 µl in ein Mikrozentrifugierröhrchen aliquotiert. Nach Zugabe von 2 µl β-Mercaptoethanol wurden die Bakterien für 10 Minuten auf Eis inkubiert. 10–20 ng der zu transformierenden DNA wurden zugegeben und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen in einem Wasserbad einem 42°C warmen und 30 Sekunden langen Hitzeimpuls ausgesetzt. Nachdem die Zellen für 2 Minuten auf Eis abgekühlt waren, wurden 900 µl 37 °C warmes NYZ⁺ Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 220 Umdrehungen in der Minute inkubiert. 100 µl dieser Bakterienkultur wurden auf die, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten, Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.11 Zellkultur

2.2.11.1 allgemeine Zellkultur

Soweit nicht anders beschrieben, wurde für die Zellkultur DMEM Medium mit 10% fötalem Kälber-Serum, 1 % Glutamin (Ultraglutamin, Bio Whittaker Europe) und 1000 µg Streptomycin/Penicillin je ml Medium) verwendet. Gegebenenfalls wurde ein entsprechendes Antibiotikum als Selektionsmittel zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und 1:10 verdünnt. Für die KA-1 Zelllinie wurde ein Östrogen-freies Kälber-Serum verwendet.

2.2.11.2 Transiente Transfektion

1×10⁵ Zellen wurden pro well (2 cm Durchmesser) in 6-well Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37 C im Brutschrank inkubiert. Die Transfektion erfolgte gemäss den Angaben des Herstellers (Fugene, Boehringer Mannheim). Zu 97 µl serumfreien DMEM Medium wurden 3 µl Fugene gegeben, anschließend wurden 1–2 µg DNA zugegeben und das Gemisch für 15 Minuten bei sterilen Bedingungen und Raumtemperatur inkubiert, bevor es dann auf die Zellen verteilt wurde. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank ruhen gelassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in dem für sie notwendigen Medium weiter inkubiert und entsprechend der durchgeführten Experimente weiterverwendet.

2.2.12 Reporterassay

2.2.12.1 Great EscAPE™ SEAP Reporter Assay System (Clontech)

1×10⁵ Zellen wurden in Sechs-well Platten (Durchmesser 2 cm) ausplattiert und nach 24 Stunden mit den entsprechenden Reporterplasmiden transfiziert (siehe Kapitel 2.2.11.2). Weitere 48 Stunden später wurden die Zellen mit dem Great EscAPE™ SEAP Reporter Assay aufgearbeitet. Dazu wurden 110 µl vom Zellmedium in ein Mikrozentrifugationsröhrchen überführt und zum Abtrennen von möglicherweise mitüberführten, abgelösten Zellen für 10 Sekunden bei 12.000 × g abzentrifugiert. 100 µl vom Überstand wurden in ein neues Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Die Proben wurden bis zum Messen der Lumineszens bei –20°C eingefroren.

Zu je 25µl Probe wurden 75µl 1× Dilution-Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 65°C in einem Heizofen inkubiert, auf Eis für 2 Minuten abgekühlt, anschließend ließ man die Proben sich langsam bis auf Raumtemperatur erwärmen. 100 µl Assay Puffer wurden zugegeben und die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 100 µl 1.25 mmol CSPD Chemilumineszens-Substrat zugegeben und die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte die Lumineszenz in einem Luminometer bestimmt werden.

2.2.12.2 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)

1×10^5 Zellen wurden in Sechswell-Platten (Durchmesser 2 cm) ausplattiert und nach 24 Stunden mit den entsprechenden Reporterplasmiden transfiziert. Als interne Transfektionskontrolle wurde ein Renilla-Luciferase Plasmid ko-transfiziert. Innerhalb jedes Experiments wurde neben den zu untersuchenden Reporterkonstrukten auch der Leervektor transfiziert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen mit dem Dualen Luciferase Reporter Assay System Kit (Promega) aufgearbeitet. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die auf Eis stehenden Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 500 μ l PLB Puffer zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellmembranen wurden in drei Gefrier-Tauzyklen aufgebrochen, die festen Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt (30s, $10000 \times g$). 20 μ l des Zelllysates wurden in Luminometer-Röhrchen gegeben und die Lumineszenz wie folgt gemessen:

- Zugabe von 25 μ l LAR II
- 10 Sekunden Messzeit der Lumineszenz der Firefly-Luciferase
- 2 Sekunden Wartezeit
- Zugabe von 25 μ l Stop and Glow
- 10 Sekunden Messzeit der Lumineszenz der Renilla-Luciferase

Die Berechnung der Werte erfolgte mit der Software Excel. Der Wert aus jeder einzelnen Transfektion ergab sich aus dem Quotienten Firefly-Luciferase (Aktivität des Konstrukts) durch Renilla-Luciferase (Transfektionskontrolle). Jede Transfektion wurde innerhalb eines Experiments sechsmal durchgeführt. Der Mittelwert von sechs Messungen wurde durch den Mittelwert der korrespondierenden Leervektor-Messungen dividiert. So erhielt man den Wert für die Aktivität des zu messenden Konstrukts relativ zum Wert des Leervektors. Die Fehlerfortpflanzung wurde dabei berücksichtigt. Wurden Promoter-Konstrukte mit Chemikalien behandelt oder eine Ko-transfektion durchgeführt, so wurden auch die Transfektionen des Leervektor-Plasmids entsprechend behandelt bzw. ebenfalls ko-transfiziert. Der Wert des Plasmids A-3, das die gesamte Promotersequenz enthält, wurde anschließend als 100% gesetzt und die weiteren Werte relativ dazu angegeben.

2.2.13 Proteinisolierung aus Zellkernen

70%-konfluent gewachsene Zellen wurden auf Eis dreimal mit kaltem PBS gewaschen, in kaltem PBS mit einem Gummischaber abgekratzt und bei $3000 \times g$ 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml 1% NP-40 enthaltenen Puffer A (10 mM HEPES [pH 7.8], 15 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA [pH 8.0]) resuspendiert und 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Der Überstand wurde abzentrifugiert und das Pellet mit 2 ml 1% NP-40 enthaltenen Puffer A gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μ l Puffer C (25 mM HEPES [pH 7.6], 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA [pH 8.0], 10 % Glycerin) aufgenommen und die Salzkonzentration bezogen auf das Gesamtvolumen auf 0.4 M NaCl eingestellt. Nach 60 Minuten auf Eis wurde das Pellet bei $12000 \times g$ abzentrifugiert und der Proteinextrakt in 20 μ l Aliquots bei $-80^\circ C$ eingefroren.

2.2.14 EMSA

Je 5 µg komplementärer, einzelsträngiger Oligonukleotide (MWG-Biotech) wurden in 40 µl Annealing-Puffer (50 mM Tris-Cl [pH 8.0], 70 mM NaCl) für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. 200 ng des doppelsträngigen Oligonukleotids wurden mit einer Polynukleotidkinase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers am 5'-Ende mit ATP [γ -³²P] (10 mCi/ml) markiert. 1 µl des markierten Oligonukleotids (20000 Zerfälle pro s je µl) wurde mit 10 µg Kernextrakt, 2 µg poly[dI-dC] (1 µg/µl) und 2 µg BSA in 20 µl 2×UB-Puffer, sowie je nach Experiment, mit 1 µl Antikörper oder einem 100fachen bzw. 1000fachen Überschuss an nicht markiertem Oligonukleotid für 30 Minuten bei Raumtemperatur (45 Minuten bei 4°C für Experimente mit Antikörper) inkubiert. Die Proben wurden auf einem 4-prozentigem SDS-freiem Acrylamidgel bei 200 V für 2 Stunden aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend bei 70°C unter Vakuum für 2 Stunden getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei –70°C auf einen Röntgenfilm exponiert.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau des humanen *H-REV107-1* Gens

Die mRNA des humanen *H-REV107-1* Gens ist 1059 bp groß und setzt sich aus vier Exons zusammen. Das Gen befindet sich auf Chromosom 11q12.3 und erstreckt sich über einen Bereich von 39700 Basen.

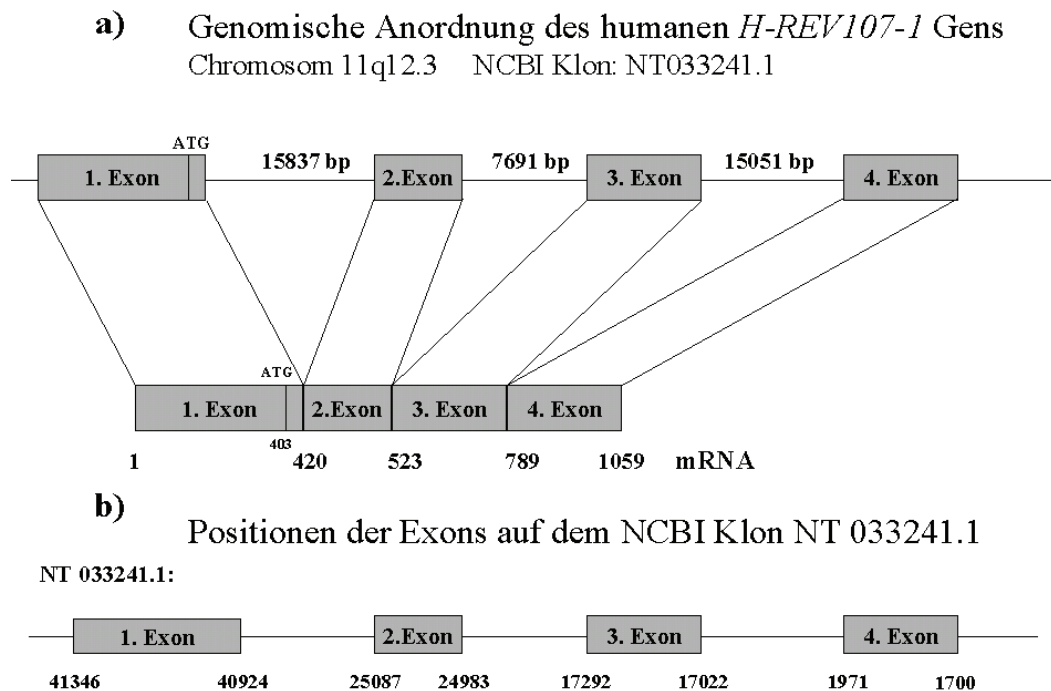


Abbildung 3: Aufbau des humanen *H-REV107-1* Gens. Die vier Exons sind über eine Länge von 39700 Basenpaaren auf Chromosom 11q12.3 lokalisiert. ATG bezeichnet den Translationsstartpunkt. Die Analyse wurde mit Hilfe der Datenbank „high throughput genome sequencing“ von NCBI durchgeführt. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

3.2 Expression von *H-REV107-1* in Säugetier-Zelllinien

3.2.1 Die *H-REV107-1* Genexpression in unbehandelten Zelllinien

Das *H-REV107-1* Gen wird in normalen Geweben der Ratte und des Menschen ubiquitär exprimiert (Sers et al., 1997; Husmann et al., 1998). Immunhistochemische Analysen humaner Proben aus Tumoren und Normalgeweben, sowie mit Hilfe eines Cancer Profiling Arrays (BDClontech™) durchgeführte Expressionsanalysen der *H-REV107-1* mRNA zeigen eine Suppression der Protein- und der mRNA-Expression in Tumoren aus Mamma, Lunge, Ovar und Niere.

Für die spätere Untersuchung der *H-REV107-1* Regulation werden zunächst verschiedene Säuger-Zelllinien auf ihre *H-REV107-1* Expression hin untersucht und möglicherweise an der Suppression beteiligte Signalwege analysiert.

Zunächst wird ein Ratten Ovarialkarzinom Modell, bestehend aus ROSE199, einer spontan immortalisierten Ratten Ovarialepithelzelllinie (Adams und Auersperg, 1985) und ROSE199A2/5, ein KRAS-transformiertes Derivat dieser Zelllinie, verwendet (Tchernitsa et al., 2004).

H-rev107-1 wird in der immortalisierten Zelllinie ROSE199 deutlich exprimiert, nicht jedoch in der KRAS-transformierten Zelllinie A2/5 (Abb. 4).

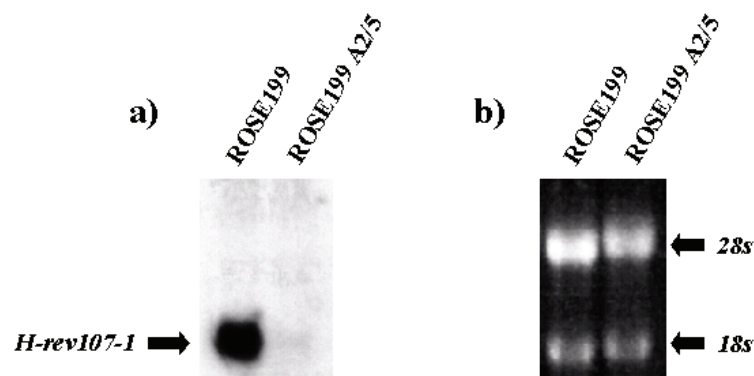


Abbildung 4: a) Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* mRNA Expression in der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 und der KRAS-transformierten Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199A2/5. Der Pfeil zeigt die *H-rev107-1* spezifische mRNA. b) Photo des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels als Ladekontrolle.

Diese Untersuchungen wurden auch in einer humanen Ovarialepithelzelllinie und verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien durchgeführt. HOSE ist eine immortalisierte, humane Ovarialepithelzelllinie (Tsao et al., 1995), OVCAR-3, SKOV-3 und A27/80 sind Ovarialkarzinomzelllinien.

Abbildung 5 a) zeigt die *H-REV107-1* mRNA Expression in diesen Zelllinien. Die Zelllinien OVCAR-3 und A27/80 exprimieren *H-REV107-1* nur sehr schwach, in den Zelllinien SKOV-3 und HOSE wird *H-REV107-1* stark exprimiert (geschlossener Pfeil). Der offene Pfeil oberhalb der *H-REV107-1* Bande zeigt die schwache Expression eines nicht näher identifizierten Gens. Diese mRNA ist etwa 6.5 kb groß. Die *H-REV107-1*-spezifische Sonde scheint an dieses Gen zu binden, obwohl sie laut Abgleich mit der NCBI-Datenbank „non-redundant genes“ spezifisch für das *H-REV107-1* Gen sein sollte. Dieses Signal wurde auch schon früher beobachtet und ist in der Literatur beschrieben (Husmann et al., 1998). Möglicherweise handelt es sich um ein Splice-Produkt des *H-REV107-1* Gens.

Bei einer Wiederholung des Versuchs (Abb. 5b) wird neben den bereits genannten Zelllinien auch die Teratokarzinomzelllinie PA-1 (Zeuthen et al., 1980) untersucht. Für die Zelllinien HOSE, SKOV-3, A27/80 und OVCAR-3 wurden die bereits bekannten Ergebnisse bestätigt. Die Teratokarzinomzelllinie PA-1 zeigt eine mittelstarke *H-REV107-1* Genexpression.

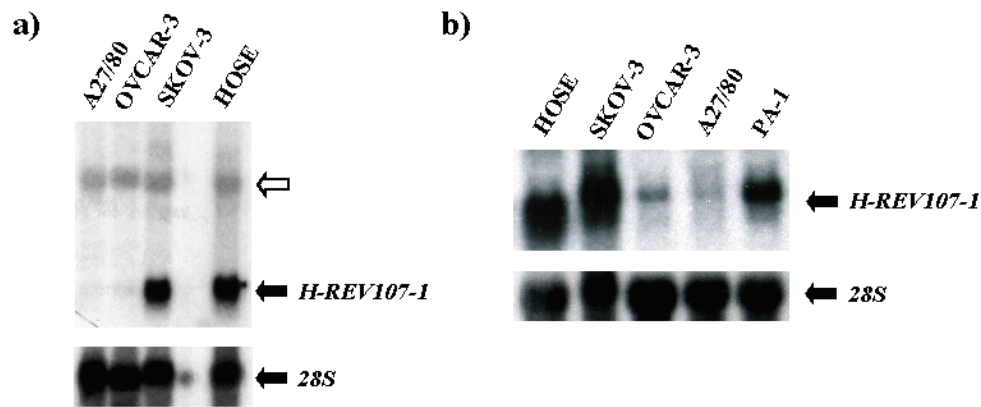


Abbildung 5: a) Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* mRNA Expression in der immortalisierten Ovarialepithelzelllinie HOSE und den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3 und A27/80. Der geschlossene Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische Bande. Der offene Pfeil zeigt die Bande des nicht näher spezifizierten Gens. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande. b) Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* mRNA Expression in der immortalisierten Ovarialepithelzelllinie HOSE, den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3 und A27/80 sowie der Teratokarzinomzelllinie PA-1. Der obere Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische Bande. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *H-REV107-1* nicht in allen humanen Zelllinien gleich stark exprimiert wird. Ein Grund für die *H-REV107-1* Suppression kann ein aktivierter RAS-Signalweg sein, da im Unterschied zur Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199, die KRAS transfizierte Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199 A2/5 kein *H-REV107-1* exprimiert. Ob auch in den humanen Zelllinien ein aktivierter RAS-Signalweg für die Suppression der *H-REV107-1* Expression verantwortlich ist, wird mit Inhibitoren der RAS-Signalwege getestet.

3.2.2 Abhängigkeit der *H-REV107-1* Genexpression von RAS-Signalwegen

In der HRAS transformierten Ratten Fibroblastenzelllinie FE8 (Sers et al., 1997; Hajnal et al., 1994) wird *H-rev107-1*, ebenso wie in der KRAS-transformierten Ratten Epithelzelllinie ROSE199 A2/5, nicht mehr exprimiert. Um einen Zusammenhang zwischen der *H-rev107-1* Expression und aktivierten RAS-Signalwegen zu ermitteln, werden der PI3K-Signalweg mit dem spezifischen Inhibitor LY294002 und der MEK/ERK-Signalweg mit dem spezifischen Inhibitor PD98059 gehemmt (Vlahos et al., 1994; Waters et al., 1995). Die aus den so behandelten Zellen isolierte RNA wird in einem Northern Blot Hybridisierungsassay untersucht. Hierfür werden zuerst die bereits zu Beginn des Kapitels beschriebenen Ratten Zelllinien ROSE199 und ROSE199A2/5 benutzt. Da *H-rev107-1* in ROSE199 exprimiert ist, wird diese Zelllinie als unbehandelte Vergleichszelllinie mit untersucht.

Das Ergebnis in Abbildung 6 a) zeigt, dass eine 48-stündige Behandlung der Zelllinie ROSE199A2/5 mit dem spezifischen Inhibitor von MEK1 PD98059 bei einer Konzentration von 50 µg/ml zu einer Aufregulation der

H-rev107-1 Genexpression führt. Das spezifische Signal ist scheinbar nicht so stark wie das *H-rev107-1*-spezifische Signal in der Zelllinie ROSE199, allerdings zeigt die Kontrollhybridisierung, dass keine gleichmäßige RNA Beladung vorliegt. Die Behandlung der Zelllinie mit 10 µg/ml LY294002 zeigt keine Änderung der *H-rev107-1* Genexpression.

Abbildung 6 b) zeigt die Abhängigkeit der *H-REV107-1* Genexpression von der Aktivität des MEK-Signalwegs in der humanen Teratokarzinomzelllinie PA-1. Die unbehandelte Zelllinie exprimiert *H-REV107-1* in einem mittelstarken Maße. Durch Inhibierung des MEK-Signalwegs wird die *H-REV107-1* Genexpression verstärkt, hingegen hat die Hemmung des PI3K-Signalwegs durch LY294002 zeigt keinen Einfluss auf die Stärke der *H-REV107-1* Genexpression. In den Zelllinien OVCAR-3 und A27/80 zeigt die Behandlung mit PD98059 bzw. LY294002 keinen Einfluss auf die *H-REV107-1* Genexpression.

Diese Experimente belegen, dass in der KRAS-transformierten Ratten Zelllinie ROSE199A2/5 die Hemmung der *H-REV107-1* Genexpression auf das aktivierte RAS-Protein zurückzuführen ist. Der verantwortliche Signalweg verläuft über die Kinase MEK. Der selbe Mechanismus ist auch für die teilweise Hemmung der *H-REV107-1* Expression in der Teratokarzinomzelllinie PA-1 verantwortlich, da diese ein mutiertes *NRAS* Gen enthält, das für ein aktiviertes NRAS Protein kodiert. In anderen Zelllinien muss es aber weitere Mechanismen der *H-REV107-1* Suppression geben, da in diesen die Hemmung der RAS-Signalwege keinen Einfluss auf die *H-REV107-1* Genexpression hat. Ein möglicher Mechanismus der Hemmung der Genexpression ist die Hypermethylierung des Promoters.

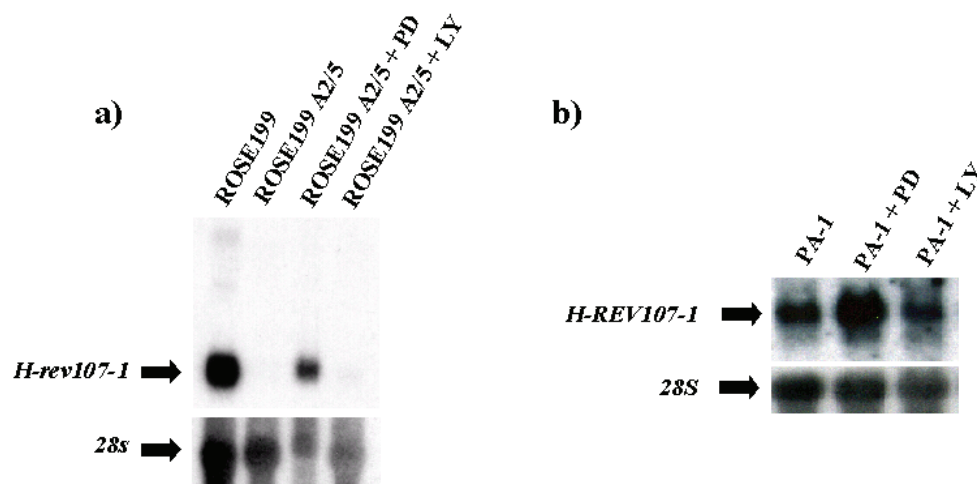


Abbildung 6: a) Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* mRNA Expression in der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 und der KRAS-transformierten Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199A2/5. ROSE199A2/5 wird 48 h mit dem MEK1 Inhibitor PD98059 (50 µg/ml), und 48 h mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (10 µg/ml) behandelt. Der obere Pfeil zeigt die *H-rev107-1*-spezifische Bande. Der untere Pfeil zeigt, zur Kontrolle der RNA-Beladung, die 28S-spezifische Bande. b) Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* mRNA Expression in der humanen Teratokarzinomzelllinie PA-1. Die Zelllinie wird 48 h mit dem MEK1 Inhibitor PD98059 (50 µg/ml) und 48 h mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (10 µg/ml) behandelt. Der obere Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische Bande. Der untere Pfeil zeigt, zur Kontrolle der RNA-Beladung, die 28S-spezifische Bande.

3.2.3 Abhängigkeit der *H-REV107-1* Genexpression von der Methylierung CpG-reicher Regionen

Durch die Methylierung von CpG-Inseln kann die Expression eines Gens unterdrückt werden. Diese Methylierung lässt sich durch Behandlung der Zelllinie mit dem Reagenz 5-Aza-2'-Desoxycytidin wieder aufheben.

Die Abbildung 7 zeigt, dass die Behandlung der Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3, A27/80, OAW und SKOV-3 mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin keinen Einfluss auf die *H-REV107-1* Genexpression hat.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jörn Walter aus Saarbrücken wird in verschiedenen Zelllinien und Gewebeproben der Einfluss des Methylierungsgrades des *H-REV107-1* Promoters und des ersten Introns auf die Expression untersucht. In den hier untersuchten Zelllinien muss aber ein anderer Mechanismus für die Hemmung der *H-REV107-1* Expression verantwortlich sein.

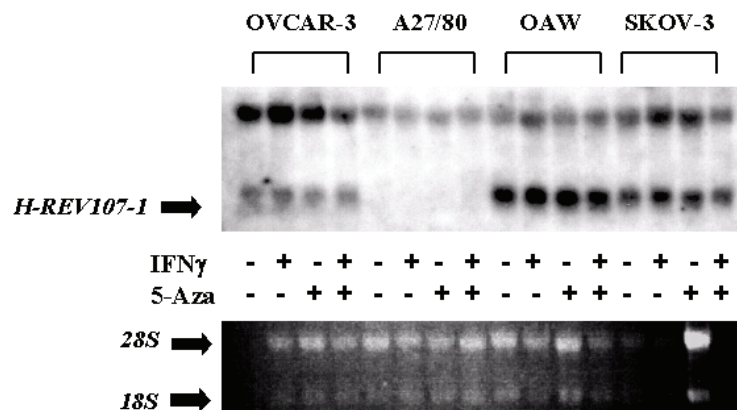


Abbildung 7: Die obere Abbildung zeigt die *H-REV107-1* Expression in einem Northern Blot Hybridisierungssassay. Die untere Abbildung zeigt das mit Ethidiumbromid angefärbte Gel als Ladungskontrolle. Die ersten vier Spuren zeigen das Ergebnis für die Zelllinie OVCAR-3, die nächsten vier Spuren für die Zelllinie A27/80, die folgenden vier Spuren für die Zelllinie OAW und die letzten vier Spuren für die Zelllinie SKOV-3. Die RNA wird aus unbehandelten, aus nur mit IFN- γ behandelten (48 Stunden, 100 U/ml), aus nur mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (48 Stunden, 1 μ mol) oder aus mit IFN- γ (48 Stunden, 100 U/ml) und 5-Aza-2'-Desoxycytidine (48 Stunden, 1 μ mol) behandelten Zellen isoliert (siehe + / - in der Legende). Im Falle der Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin wird das Medium nach 24 Stunden gewechselt. Der obere Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische Bande.

3.3 *H-REV107-1* als Zielgen von IFN- γ und IRF-1

3.3.1 Expression von *H-REV107-1* nach der Applikation von IFN- γ

Seit 1995 ist bekannt, dass in Ratten Astrocyten die *H-rev107-1* Expression durch IFN- γ aktiviert werden kann (Kuchinke et al., 1995). IFN- γ ist ein Zytokin, das unter anderem in der vireninduzierten Zellantwort eine Rolle spielt. Eine wichtige Eigenschaft des IFN- γ ist die Aktivierung der STAT-Signalwege und der damit verbundenen Stimulation weiterer Gene. Um zu untersuchen, in wieweit die *H-REV107-1* Expression auch in anderen Zelllinien durch IFN- γ aktiviert werden kann, werden verschiedene Ratten und humane Zelllinien mit IFN- γ behandelt und die *H-REV107-1* Genexpression in einem Northern Blot Hybridisierungsassay untersucht.

Die Behandlung der ROSE Zellen mit 500 U bzw. 1000 U/ml IFN- γ führt in ROSE199 zu einem starken, konzentrationsabhängigen Anstieg der *H-rev107-1* Genexpression. Bei gleicher Behandlung der ROSE199A2/5 Zellen ist kein Anstieg der *H-rev107-1* Genexpression feststellbar (Abb. 8).

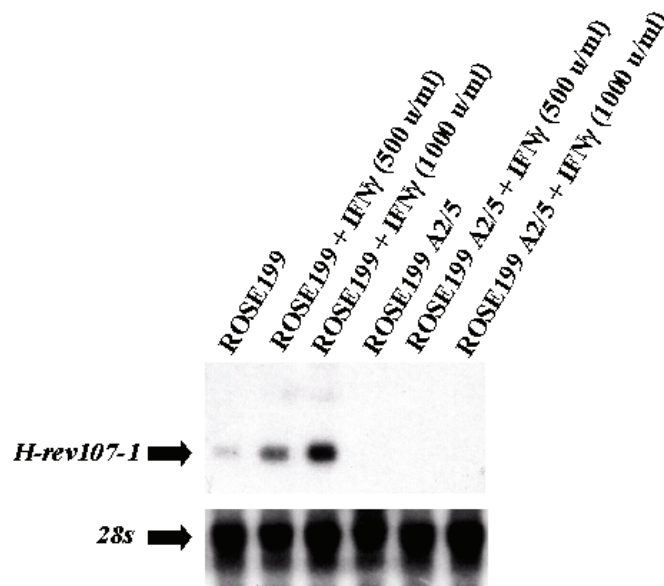


Abbildung 8: Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* mRNA Expression in der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 und der KRAS-transformierten Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199A2/5. Die Zellen sind unbehandelt oder wurden für 48 Stunden mit 500 U/ml oder 1000 U/ml IFN- γ behandelt . Der Pfeil zeigt die *H-rev107-1*-spezifische mRNA. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

IFN- γ initiiert durch Bindung an seinen Rezeptor eine spezifische Signalkaskade. Dies führt zur Trans-Phosphorylierung und Aktivierung des JAK1/JAK2-Komplexes und der nachfolgenden Phosphorylierung von STAT1. STAT1 löst sich von seinem Rezeptor und bildet STAT1-Homodimere. Diese translokalisieren in den Nukleus und induzieren die Expression von Zielgenen, die eine GAS-Bindungsstelle in ihrem Promoter besitzen (Ihle und Kerr, 1995). IRF-1 besitzt eine GAS-Bindungsstelle in seinem Promoter und wird durch IFN- γ induziert (Harada et al., 1994). IRF-1 ist selbst ein Transkriptionsfaktor, der neben seiner Rolle in der Immunantwort auch als Tumorsuppressor aktiv sein kann und das Zellwachstum inhibiert (Tanaka et al., 1996).

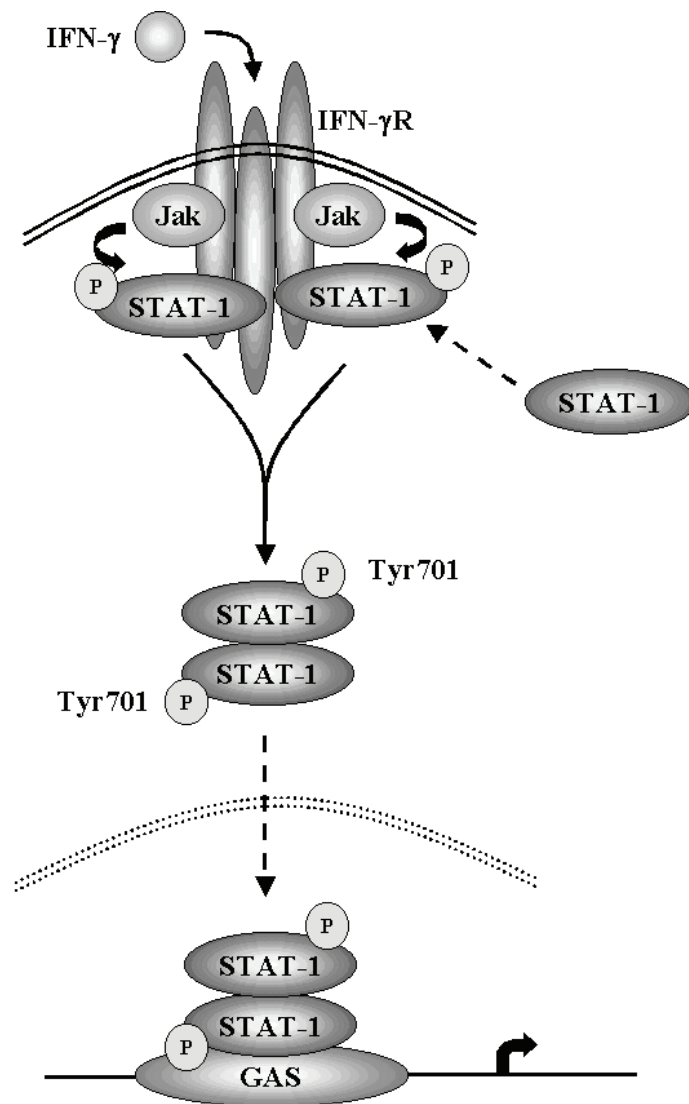


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des STAT-Signalwegs. Das STAT-1 Homodimer bindet im Zellkern an die GAS-Bindungsstelle eines Promotors und aktiviert die Expression des zugehörigen Gens (Ramana et al., 2002).

Eine Korrelation zwischen der *H-REV107-1* und der *IRF-1* Expression würde einen Hinweis auf eine mögliche Abhängigkeit des *H-REV107-1* Gens von der IRF-1 Aktivität geben. Dazu werden Northern Blots erst mit einer *H-REV107-1*-spezifischen und anschließend mit einer *IRF-1*-spezifischen Sonde hybridisiert.

In der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 wird die *Irf-1* Genexpression durch Behandlung mit IFN-γ in einer dosisabhängigen Weise induziert, die mit der Induktion der *H-rev107-1* Genexpression korreliert (Abb. 10). In der KRAS-transformierten Zelllinie ROSE199A2/5 zeigt sich keine Änderung der *Irf-1* Genexpression. Offenbar ist die Induzierbarkeit von *Irf-1* in diesen Zellen gehemmt. Das gleiche Bild zeigt sich bei der Aktivierung der *H-rev107-1* Expression durch IFN-γ. Auch hier erfolgt keine Aufregulation der Genexpression.

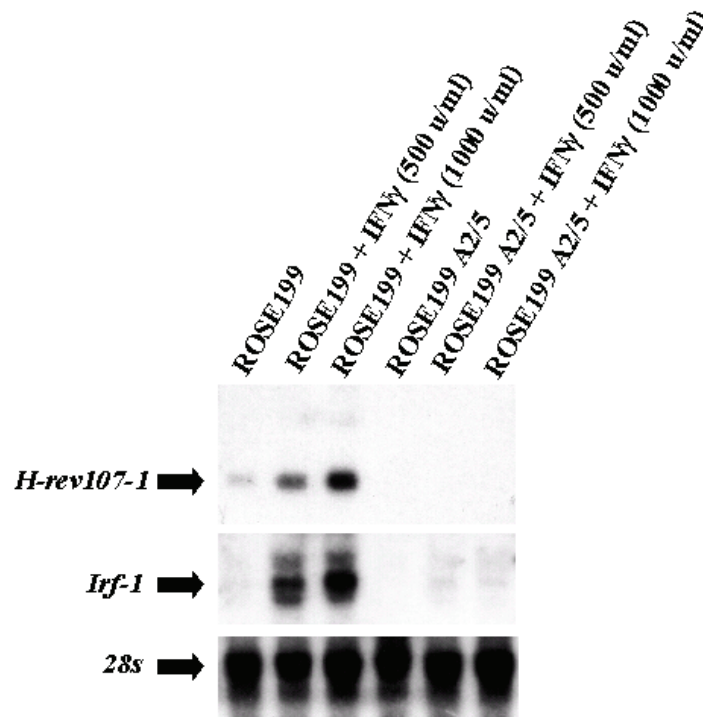


Abbildung 10: Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* und der *Irf-1* mRNA Expression in der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 und der KRAS-transformierten Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199A2/5. Die Zellen sind unbehandelt oder 48 h mit 500 U oder 1000 U IFN- γ /ml behandelt. Die beiden oberen Pfeile zeigen die *H-rev107-1* und die *Irf-1* spezifische mRNA. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der untere Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

Eine direkte Abhängigkeit der *H-rev107-1* Expression von der *Irf-1* Expression ist damit jedoch nicht bewiesen.

3.3.2 Induktion der *H-rev107-1* Expression mittels Östrogen-induzierbarer Aktivität von Irf-1

Um zu überprüfen, ob die IFN- γ abhängige Induktion der *H-rev107-1* Expression nicht parallel, sondern in direkter Abhängigkeit von der Irf-1 Genexpression verläuft, wird ein NIH3T3 Zellsystem benutzt, welches ein Fusionskonstrukt aus Irf-1 und dem humanen Östrogen-Rezeptor (hER) stabil exprimiert (KA-1 Zelllinie) (Kirchhoff und Hauser, 1999). Von diesem Plasmid aus wird ein inaktives Irf-1/hER Fusionsprotein translatiert, welches erst durch Zugabe von Östrogen und der damit verbundenen Konformationsänderung des Rezeptors in eine aktive Irf-1 Form übergeht. Durch gleichzeitige Zugabe von Cycloheximid, einem Proteinsyntheseinhibitor, können Zwischenschritte ausgeschlossen werden, die über eine IRF-1-induzierte Expression und anschließende Translation weiterer Gene zu einer *H-rev107-1* Expression führen könnten. Bei Genen, deren Expression durch Aktivierung des IRF-1 Proteins unter diesen Bedingungen induziert wird, handelt es sich also um direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors IRF-1.

In einem Northern Blot Hybridisierungsassay (Abb. 11) wird die *H-rev107-1* Genexpression in der unbehandelten Zelllinie (Irf-1 inaktiv), in der mit Östrogen behandelten Zelllinie (1 μ mol, 48 Stunden; Irf-1

aktiv, weitere Proteinsynthese möglich) und in der mit Östrogen und Cycloheximid behandelten Zelllinie (Östrogen 1 μmol , Cycloheximid 50 μmol , gemeinsam 48 Stunden; Irf-1 aktiv, keine Proteinsynthese möglich) verglichen.

Dieses Experiment zeigt, dass es durch die Zugabe von Östrogen und der damit verbundenen Aktivierung von Irf-1, zu einer Induktion des *H-rev107-1* Gens kommt. Eine weitere Proteinsynthese ist dazu nicht nötig. *H-rev107-1* ist ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors Irf-1.

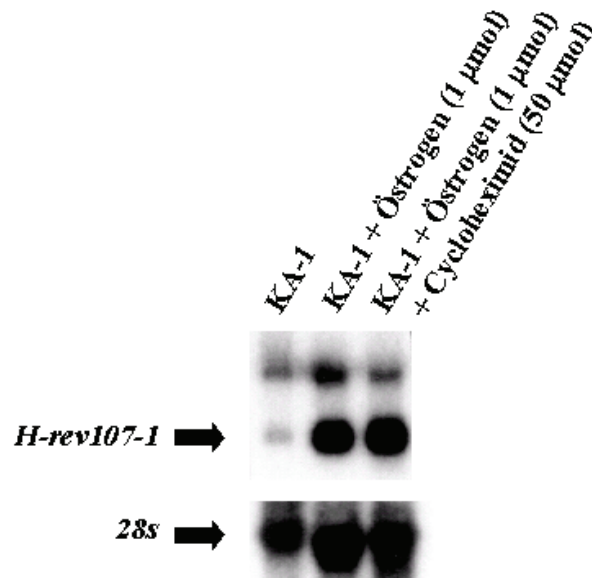


Abbildung 11: Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* mRNA Expression in der Zelllinie KA-1. Die Zellen sind unbehandelt bzw. für 48 Stunden mit Östrogen (1 μmol) oder mit Östrogen (1 μmol) und Cycloheximid (50 μmol) behandelt. Der Pfeil zeigt die *H-rev107-1*-spezifische mRNA. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

Auf Grund des funktionellen Zusammenhangs zwischen der Irf-1 Aktivierung und der *H-rev107-1* Expression wird jetzt in den humanen Ovarialkarzinomzelllinien die Abhängigkeit von *H-REV107-1* von IFN- γ und IRF-1 genauer analysiert.

3.3.3 Korrelation der *H-REV107-1* und der *IRF-1* Genexpression in humanen Zelllinien

Zunächst werden die zuvor auf *H-REV107-1* Expression untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3, A27/80, die immortalisierte Ovarialepithelzelllinie HOSE und die Teratokarzinomzelllinie PA-1 in einem Northern Blot Hybridisierungsassay auf die Expression von *IRF-1* hin untersucht (Abb. 12).

Die Stärke der *IRF-1* Genexpression korreliert, mit Ausnahme der Zelllinie PA-1, mit der Expressionsstärke des *H-REV107-1* Gens. HOSE und SKOV-3 zeigen eine hohe, OVCAR-3 und A27/80 eine deutlich schwächere *IRF-1* Genexpression. Die Zelllinie PA-1, die nur eine mittelstarke *H-REV107-1* Genexpression zeigt, weist sehr wenig *IRF-1* auf.

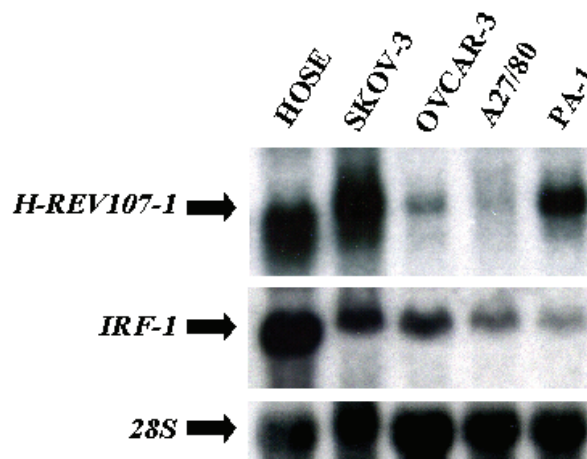


Abbildung 12: Northern Blot Analyse von *H-REV107-1* und *IRF-1* in der immortalisierten Ovarialepithelzelllinie HOSE, den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3 und A27/80 sowie der Teratokarzinomzelllinie PA-1. Die beiden oberen Pfeile zeigen die *H-REV107-1*- und die *IRF-1*-spezifische Bande. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der untere Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

Möglicherweise ist die, im Vergleich zu HOSE, in OVCAR-3 und A27/80, sehr geringe Menge *IRF-1* mRNA für die Hemmung der *H-REV107-1* Expression verantwortlich. In der Zelllinie PA-1 scheint die *H-REV107-1* Expression nicht von einer *IRF-1* Expression abhängig zu sein.

Um die Abhängigkeit der *H-REV107-1* von der *IRF-1* Expression weiter zu analysieren, wird jetzt die IFN- γ vermittelte Induktion der Genexpression untersucht. Dazu wird die in der Ratten Zelllinien gemachte Beobachtung, dass die *H-rev107-1* Genexpression durch IFN- γ induzierbar ist und diese Expression mit der *Irf-1* Genexpression korreliert, auch in humanen Ovarialkarzinomzelllinien und in einer Nierenkarzinomzelllinie überprüft. Auch hier werden die zuvor mit einer *H-REV107-1*-spezifischen Sonde hybridisierten Northern Blots erst von der *H-REV107-1* Sonde gereinigt und anschließend mit einer *IRF-1*-spezifischen Sonde hybridisiert.

Das Ergebnis wird in der Abbildung 13a gezeigt. Durch Behandlung mit IFN- γ ist in der Zelllinie OVCAR-3 die *H-REV107-1* Expression deutlich induzierbar, während in der Zelllinie A27/80 die *H-REV107-1* Expression nur schwach induzierbar ist. Sowohl die Induzierbarkeit als auch die relative Menge der *IRF-1* Genexpression korreliert deutlich mit der *H-REV107-1* Expression. Eine Wiederholung des Experiments zeigt das selbe Ergebnis.

Als weitere Zelllinie wird die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 getestet. Wie in Abbildung 13b zu sehen ist, exprimiert bereits die unbehandelte Zelllinie gut nachweisbare Mengen der *H-REV107-1* mRNA. Bei der Behandlung der Zelllinie mit 500 U/ml IFN- γ ist die Zunahme der *H-REV107-1* mRNA, sowie die damit korrelierende Induzierbarkeit der *IRF-1* Expression, deutlich zu sehen. Auf dem Northern Blot der Ladungskontrolle wird deutlich, dass in der Spur SKOV-3 + IFN- γ (1000 U/ml) sehr viel weniger mRNA aufgetragen worden ist. Eine Extrapolation der Mengen lässt den Schluss zu, dass auch bei Zugabe von 1000 U/ml IFN- γ von einer Korrelation zwischen der Zunahme der *H-REV107-1* und *IRF-1* Genexpression ausgegangen werden kann.

Die unbehandelten, humanen Nierenkarzinomzelllinien RCC26 endo und RCC26 exo zeigen eine schwache *H-REV107-1* und *IRF-1* Expression. Bei der Zelllinie RCC26 exo handelt es sich um ein Derivat der Zelllinie RCC 26 endo, erzeugt durch die stabile Transfektion eines INF- γ -Expressionsplasmids (Jung et al., 1998). Durch eine 48stündige Behandlung der Zelllinien mit 500 U bzw. 1000 U/ml IFN- γ wird sowohl die *H-REV107-1* als auch die *IRF-1* Genexpression deutlich induziert (Abb. 13c).

Die bisherigen Untersuchungen zeigen eine Korrelation zwischen der Expression der *H-REV107-1* und der *IRF-1* mRNA. Dies gilt aber nur für den Zeitpunkt 48 Stunden nach Behandlung der jeweiligen Zelllinie mit IFN- γ . Als nächstes soll die zeitabhängige Korrelation der mRNA Mengen über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

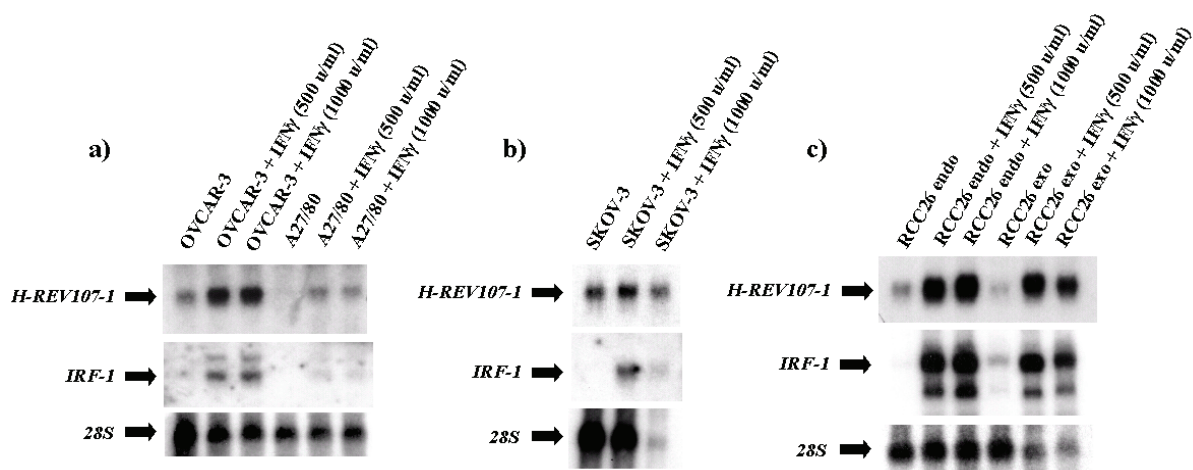


Abbildung 13: a) Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* und *IRF-1* mRNA Expression in den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und A27/80. Die Zellen sind unbehandelt bzw. 48h mit 500 U oder 1000 U IFN- γ /ml behandelt. Die beiden oberen Pfeile zeigen die *H-REV107-1*- und die *IRF-1*-spezifische mRNA. Der untere Pfeil zeigt, zur Kontrolle der RNA-Beladung, die 28S-spezifische Bande. b) Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* und *IRF-1* mRNA Expression in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3. Die Zellen sind unbehandelt bzw. 48h mit 500 U oder 1000 U IFN- γ /ml behandelt. Die beiden oberen Pfeile zeigen die *H-REV107-1*- und die *IRF-1*-spezifische mRNA. Der untere Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande. c) Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* und *IRF-1* mRNA Expression in den Nierenkarzinomzelllinien RCC26 endo und RCC26 exo. Die Zellen sind unbehandelt bzw. 48h mit 500 U oder 1000 U IFN- γ pro ml Kulturmedium behandelt. Die beiden oberen Pfeile zeigen die *H-REV107-1*- und die *IRF-1*-spezifische mRNA. Der untere Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

3.3.4 Zeitabhängige Korrelation der Genexpression von *H-REV107-1* und *IRF-1*

Für die Analyse der zeitlichen Abhängigkeit der *H-REV107-1* Expressionen nach Induktion des IFN- γ Signalwegs werden die humanen Ovarialkarzinomzelllinien A27/80 und OVCAR-3 mit 100 bzw. 1000 U/ml IFN- γ behandelt. Nach Behandlung mit 100 U/ml IFN- γ wird zu den Zeitpunkten 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden die mRNA aus den behandelten Zellen isoliert. Nach der Behandlung mit 1000 U/ml IFN- γ wird die mRNA der behandelten Zellen zu den Zeitpunkten 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden isoliert.

Im Fall der Zelllinie A27/80 erfolgt nach Applikation von 100 U/ml IFN- γ nach sechs Stunden eine schwache Aufregulation der *H-REV107-1* Genexpression (Abb. 14). Diese bleibt bis zum Zeitpunkt "12 Stunden" erhalten und lässt dann wieder nach. Die Aufregulation der *IRF-1* Genexpression ist bereits nach drei Stunden sichtbar, allerdings ist die Menge noch sehr gering. Nach sechs Stunden sieht man eine deutliche Aufregulation der *IRF-1* mRNA. Diese bleibt bis zum Zeitpunkt "12 Stunden" erhalten. Während man nach 24 Stunden noch eine geringe Menge der *H-REV107-1* mRNA sehen kann, ist die mRNA des Gens *IRF-1* nicht mehr erkennbar.

Die Induktion der *IRF-1* Genexpression korreliert mit der Induktion der *H-REV107-1* Genexpression. Dabei zeigt die *IRF-1* mRNA einen geringfügigen, zeitlichen Vorlauf zur *H-REV107-1* Expression.

Bei Behandlung der Zelllinie A27/80 mit 1000 U/ml IFN- γ sieht man nach drei Stunden eine Aufregulation der *H-REV107-1* und *IRF-1* Genexpression. Diese erreicht ihr erstes, relativ schwaches Maximum zum Zeitpunkt "9 Stunden". Zum Zeitpunkt "12 Stunden" ist die *H-REV107-1* mRNA nicht mehr sichtbar, parallel dazu hat die Menge der *IRF-1* mRNA ebenfalls abgenommen. Nach 24 Stunden der Induktion erfolgt eine erneute, sehr starke Aufregulation der Expression der beiden Gene. Hier liegt ein, im Vergleich zum ersten, viel stärkeres, zweites Maximum. Zum Zeitpunkt "48 Stunden" hat die Expressionsstärke der Gene wieder stark nachgelassen. Diese Entwicklung setzt sich fort, so dass zum Zeitpunkt "72 Stunden" *H-REV107-1* und zum Zeitpunkt "96 Stunden" beide Gene nicht mehr detektierbar sind. Bei der Behandlung der Zelllinie A27/80 mit 1000 U/ml IFN- γ besteht ebenfalls eine deutliche Korrelation zwischen der Expression der Gene *H-REV107-1* und *IRF-1*, wobei die Induktion beider Gene ein wellenförmiges Verhalten zeigt.

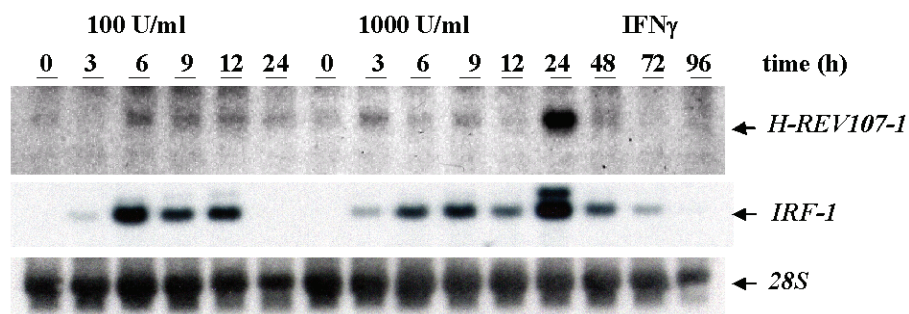


Abbildung 14: Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* und *IRF-1* mRNA Expression zu verschiedenen Zeitpunkten in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie A27/80. Die Zellen sind über einen Zeitraum von 24 Stunden (100 U/ml) bzw. 96 Stunden (1000 U/ml) mit 100 U/ml oder 1000 U/ml IFN- γ pro ml Kulturmedium behandelt. Der obere Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische, der mittlere Pfeil die *IRF-1*-spezifische und der untere Pfeil die 28S-spezifische mRNA.

In der Zelllinie OVCAR-3 beginnt bei der Behandlung mit 100 U/ml IFN- γ nach drei Stunden die Aufregulation der *H-REV107-1* und *IRF-1* Genexpression (Abb. 15) und erreicht zum Zeitpunkt "12 Stunden" ein deutliches Maximum. Zum Zeitpunkt "24 Stunden" hat die Expression der beiden Gene wieder stark nachgelassen und befindet sich auch unter dem Expressionsniveau des Zeitpunkts "3 Stunden". Die Expression der Gene verläuft parallel. Die Induktion der *H-REV107-1* und *IRF-1* Genexpression setzt gleichzeitig ein. Im Vergleich zu der Zelllinie A27/80 erreicht die Expression der *H-REV107-1* und der *IRF-1* mRNA ein höheres Niveau und hält länger an.

Nach Behandlung mit 1000 U/ml IFN- γ , sieht man bei den Zelllinien OVCAR-3 und A27/80 einen deutlichen Unterschied im Verlauf der *IRF-1* Expression. Die *H-REV107-1* Genexpression ist, wie im Fall der Induktion mit 100 U/ml IFN- γ , bereits nach drei Stunden sichtbar und nimmt langsam weiter zu, bis sie zum Zeitpunkt "9 Stunden" ein Maximum erreicht. Danach sinkt die mRNA Menge wieder unter das Niveau des Zeitpunkts "3 Stunden". Zum Zeitpunkt "48 Stunden" erreicht sie ein zweites, aber schwächeres Maximum. Anschließend nimmt die Menge der mRNA wieder ab, bis sie sich zum Zeitpunkt "96 Stunden" wieder auf dem Niveau der unbehandelten Zelllinie befindet. Die Induktion der *IRF-1* mRNA verhält sich so, dass bereits nach drei Stunden ein starkes Maximum erreicht ist, von dem aus die mRNA Menge kontinuierlich abnimmt. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt "96 Stunden" ist die Menge der induzierten *IRF-1* mRNA nur noch sehr gering, im Vergleich zur unbehandelten Zelllinie aber deutlich sichtbar.

Der Verlauf der Expression beider Gene korreliert bei der Behandlung mit 1000 U/ml IFN- γ nicht so deutlich wie bei den anderen gemessenen Zeitkurven. Zwar zeigen beide Gene bereits nach drei Stunden eine Aufregulation ihrer Genexpression, doch fällt sie bei *IRF-1* im Vergleich zur Induktion mit 100 U/ml IFN- γ sehr stark aus. Während die *H-REV107-1* Expression zum Zeitpunkt "9 Stunden" ein Maximum hat, fällt die Menge der *IRF-1* mRNA bereits nach drei Stunden wieder kontinuierlich ab. Dagegen zeigt die Induktion der *H-REV107-1* mRNA zum Zeitpunkt "48 Stunden" noch ein zweites, schwächeres Maximum, um dann bis zum Zeitpunkt "96 Stunden" auf das Niveau der Genexpression der unbehandelten OVCAR-3 Zelllinie abzusinken. In der Zelllinie OVCAR-3

sieht man im Fall der Applikation von 1000 U/ml IFN- γ keine Korrelation im Verlauf der *H-REV107-1* und der *IRF-1* Expression. Die Zelllinie verhält sich in diesem Fall deutlich anders als die Zelllinie A27/80.

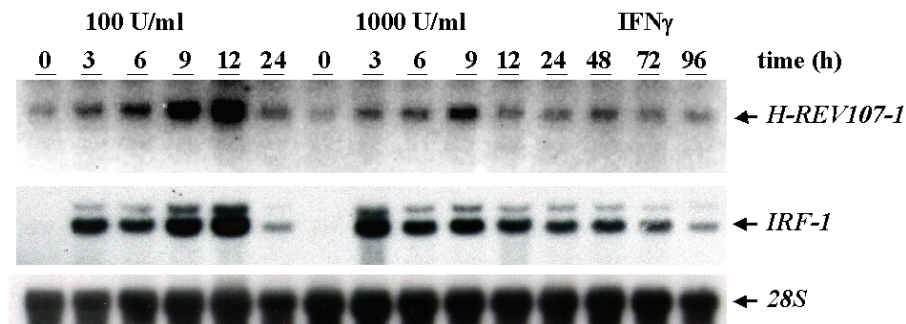


Abbildung 15: Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* und *IRF-1* mRNA Expression zu verschiedenen Zeitpunkten in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3. Die Zellen sind über einen Zeitraum von 24 Stunden (100 U) bzw. 96 Stunden (1000 U) mit 100 U oder 1000 U IFN- γ pro ml Kulturmedium behandelt worden. Der obere Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische, der mittlere Pfeil die *IRF-1*-spezifische und der untere Pfeil die 28S-spezifische mRNA.

Die Frage nach der Korrelation der *H-REV107-1* Expression von der *IRF-1* Genexpression, lässt sich mit einem klaren Ja beantworten.

1. Bei den Zelllinien HOSE und SKOV-3 ist dies bereits im unbehandelten Zustand deutlich zu sehen. Hier werden sowohl *H-REV107-1* als auch *IRF-1* auf hohem Niveau exprimiert. In den Zelllinien OVCAR-3, A27/80, RCC26 und SKOV-3 korrelieren die IFN- γ induzierte *H-REV107-1* und *IRF-1* Expression. In A27/80 und OVCAR-3 zeigt die zeitabhängige Induktion der *H-REV107-1* und der *IRF-1* Expression abhängig von der IFN- γ Dosis einen parallelen Verlauf.
2. Die Überexpression des hER/IRF-1 Expressionsplasmids in der Zelllinie KA-1 führt zu einer direkten Expression des *H-REV107-1* Gens.

Dies zeigt, dass *H-REV107-1* mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zielgen von IRF-1 ist. Nur für die Zelllinie PA-1 konnte keine Korrelation zwischen der Expression der beiden Gene gezeigt werden. Möglicherweise verhindert hier die RAS-abhängige Hemmung der *H-REV107-1* Expression eine Aktivierung der Expression durch IFN- γ bzw. über IRF-1.

3.3.5 *H-REV107-1* als Zielgen des MAPK- und des STAT-Signalwegs

Die IFN-vermittelte Signaltransduktion kann durch das RAS Onkoprotein auf verschiedenen Ebenen gestört werden. Onkogenes KRAS reicht aus, um die Genexpression von *STAT-1* und *STAT-2* zu inhibieren. Des weiteren zeigen IFN- γ induzierbare Gene in einer Zelllinie mit endogen mutiertem *KRAS*, im Vergleich zu einer Zelllinie ohne *KRAS* Mutation, eine stark verminderte Expression. Eine Inaktivierung des onkogenen *KRAS* führt zu einer verstärkten Expression der IFN- γ induzierbaren Gene, die dem Expressionsniveau der Zelllinie ohne *KRAS* Mutation entspricht (Klampfer et al., 2003). Das geschieht möglicherweise auf Grund einer Wechselwirkung

zwischen dem MEK/ERK-Signalweg und IRF-1. In der Literatur sind Beispiele beschrieben, die zeigen, dass IRF-1 hemmend auf den MEK/ERK-Signalweg wirken kann. Während aktiviertes IRF-1 die Hemmung des Zellwachstums in NIH3T3 Zellen bewirkt, führt die gleichzeitige Aktivierung von IRF-1 und dem MEK/ERK-Signalweg zur Apoptose der NIH3T3 Zellen (Kirchhoff und Hauser, 1999). Die Aktivierung des hER/IRF-1 Fusionproteins in NIH3T3 Zellen, die mit verschiedenen Onkogenen (z.B. *c-myc*) transformiert waren, führt zu einer Reversion des malignen Phänotyps. In Nacktmäusen führt die Aktivierung von IRF-1 zu einer Suppression der transformierten Zellen (Kroger et al., 2003).

IRF-1 ist ein Zielgen des STAT1-Signalwegs und vermittelt einen Teil der IFN- γ Antwort, indem es als Transkriptionsfaktor weitere Zielgene aktiviert. *H-REV107-1* ist ein Zielgen von IRF-1 und lässt sich ebenfalls durch IFN- γ induzieren. Außerdem wird die *H-REV107-1* Genexpression durch aktiviertes RAS unterdrückt. Auf Grund der in der Literatur beschriebenen Daten, die eine Interaktion zwischen dem STAT-Signalweg und dem MEK-Signalweg nachweisen, wird eine mögliche Korrelation zwischen der Aktivität des MEK-Signalwegs und der Expression von IRF-1 überprüft.

In der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 wird die *Irf-1* Genexpression durch Behandlung mit IFN- γ induziert, in der KRAS-transformierten Zelllinie ROSE199A2/5 zeigt sich hingegen keine Änderung der *Irf-1* bzw. der *H-rev107-1* Genexpression nach Applikation von IFN- γ (Abb. 10). Die IFN- γ vermittelte Induktion von *Irf-1* ist in diesen Zellen offenbar gehemmt. Allerdings kann in dieser Zelllinie die *H-rev107-1* Genexpression durch Inhibition des MEK-Signalwegs mit PD98059 wieder hergestellt werden. Es zeigt sich, dass ROSE199A2/5 im unbehandelten Zustand genauso viel *Irf-1* wie ROSE199 exprimiert. Durch Inhibierung des MEK-Signalwegs mit PD98059 wird in der ROSE199A2/5 Zelllinie *Irf-1* stärker exprimiert als in ROSE199 (Abb. 16). Auch *H-rev107-1* wird in beiden Zelllinien nach Behandlung mit PD98059 verstärkt exprimiert. Allerdings liegt für *H-rev107-1* das Expressionsniveau in der Zelllinie ROSE199 höher, wobei *H-rev107-1* in ROSE199 auch im unbehandelten Zustand exprimiert wird.

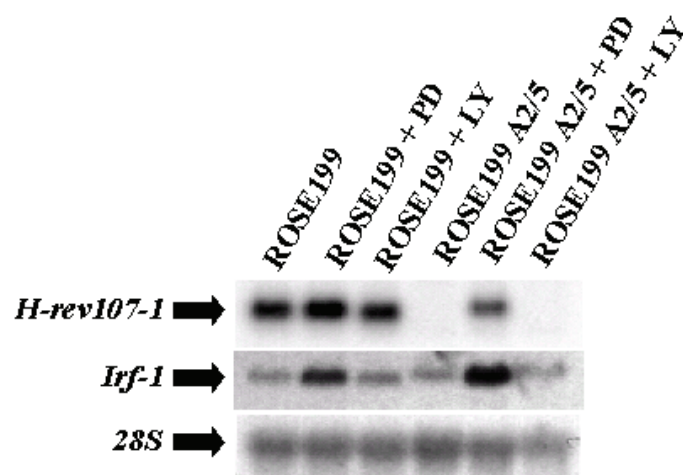


Abbildung 16: Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* und der *Irf-1* mRNA Expression in der Ratten Ovarialepithelzelllinie ROSE199 und der KRAS-transformierten Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199A2/5. ROSE199 und ROSE199A2/5 wird 48h mit dem MEK Inhibitor PD98059 (50 µg/ml) und 48h mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (10 µg/ml) behandelt. Die oberen Pfeile zeigen die *H-rev107-1* und die *Irf-1* spezifische Bande. Anschließend wird der selbe Blot zur Kontrolle der RNA-Beladung mit einer 28S Sonde hybridisiert. Der untere Pfeil zeigt die 28S-spezifische Bande.

Die Hemmung des MEK-Signalwegs führt zu einer Induktion der *H-rev107-1* und der *Irf-1* Genexpression. Beide Zelllinien zeigen im unbehandelten Zustand eine gleichstarke *Irf-1*, jedoch nur ROSE199 eine *H-rev107-1* Expression. Auf Grund der viel stärkeren Aktivierung des MEK-Signalwegs in der KRAS-transformierten Zelllinie ROSE199A2/5, wird außerdem die *H-rev107-1* Expression auf eine Weise negativ beeinflusst, die durch die verstärkte Expression von *Irf-1* nur teilweise wieder aufgehoben werden kann. Daher soll jetzt die Auswirkung einer Hemmung des MAPK-Signalwegs mit PD98059 bei gleichzeitiger Aktivierung der *IRF-1* Expression durch IFN-γ auf die *H-REV107-1* Expression untersucht werden.

Wie Abbildung 17 zeigt, wird, durch gleichzeitige Zugabe von 50 µmol PD98059 und 1000U/ml IFN-γ, die Induktion der *H-rev107-1* Genexpression um ein Vielfaches verstärkt.

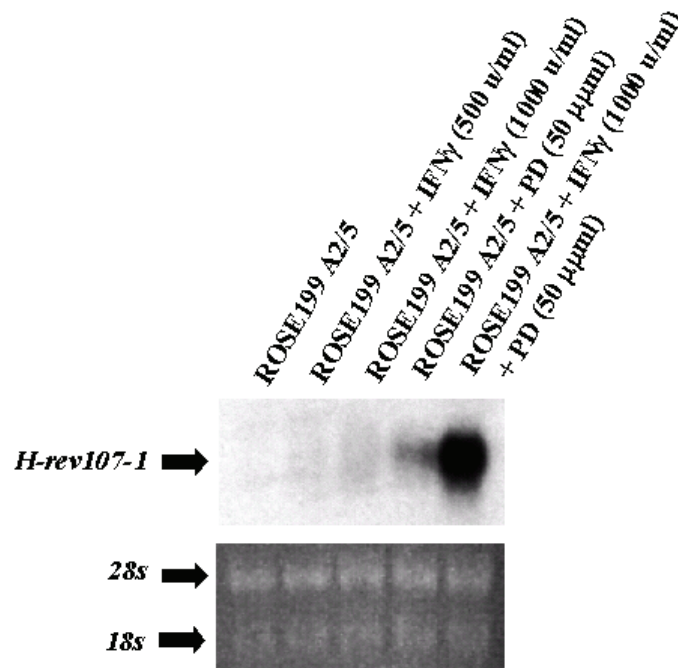


Abbildung 17: Oben: Northern Blot Analyse der *H-rev107-1* mRNA Expression in der KRAS-transformierten Ratten Ovarialkarzinomzelllinie ROSE199A2/5. Die Zellen sind unbehandelt, 48 Stunden mit 500 U oder 1000U/ml IFN-γ, 48 Stunden mit 50 µmol PD98059 oder 48 Stunden gleichzeitig mit 50 µmol PD98059 und 1000U/ml IFN-γ behandelt worden. Der Pfeil zeigt die *H-rev107-1*-spezifische mRNA. Unten: Photo des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels als Ladekontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen einem IFN-γ induzierten Signalweg und dem MEK-Signalweg für die Expression von *H-rev107-1* von Bedeutung ist. Der aktivierte MEK-Signalweg scheint die

IFN- γ induzierte *H-rev107-1* Expression zu verhindern. Durch die Blockade des MEK-Signalwegs wird diese Hemmung wieder aufgehoben. Die Induktion der *H-rev107-1* Expression durch die Behandlung der Zelllinie mit PD98059 und IFN- γ führt zu einem synergistischen Effekt.

Ähnlich wie in ROSEA2/5 wurde auch in der Ovarialkarzinomzelllinie A27/80 nach Induktion mit IFN- γ keine nennenswerte Aufregulation der *H-REV107-1* Genexpression beobachtet. Daher wird getestet, ob auch hier ein Synergieeffekt bei der Induktion der *H-REV107-1* Genexpression durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit IFN- γ und PD98059 nachweisbar ist.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, kann nach gleichzeitiger Applikation von IFN- γ und PD98059 keine Verstärkung der *H-REV107-1* Genexpression beobachtet werden. Es gibt keinen Synergieeffekt.

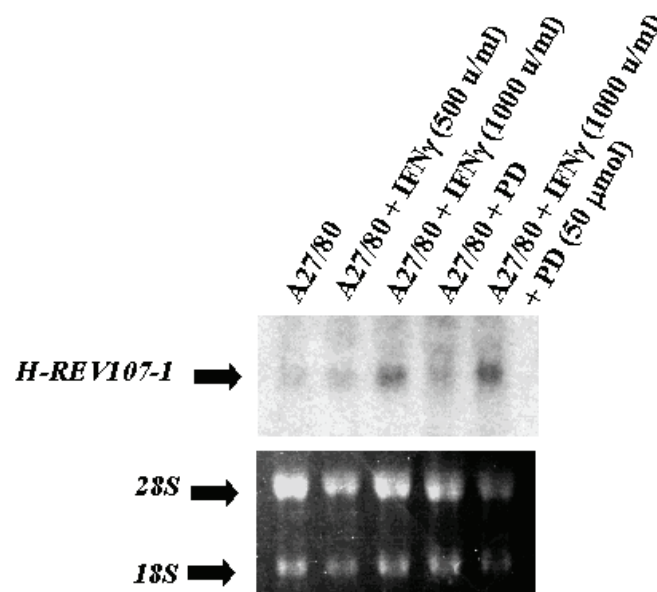


Abbildung 18: Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* mRNA Expression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie A27/80. Die Zellen sind unbehandelt, 48 Stunden mit 500 U/ml oder 1000U/ml IFN- γ behandelt oder 48 Stunden mit 50 μ mol PD98059 bzw. gleichzeitig mit 50 μ mol PD98059 und 1000U/ml IFN- γ behandelt. Der Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische mRNA. Als Ladungskontrolle dient das Photo des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels.

In den Zelllinien ROSEA2/5 und A27/80 ist eine deutliche Wechselwirkung zwischen dem MEK-Signalweg und dem IFN- γ -induzierten Signalweg zu sehen. Hier führt die Blockade des MEK-Signalwegs bei gleichzeitiger Induktion des IFN- γ -induzierten Signalwegs zu einer Aufregulation der *H-REV107-1* Genexpression. Die alleinige Zugabe von PD98059 reicht aus, um die *H-rev107-1* Expression zu induzieren. Dieser Effekt kann mit der alleinigen Zugabe von IFN- γ nicht erreicht werden.

Abhängigkeit der *H-REV107-1* Genexpression von TNF- α -Signalwegen

Um auch die Rolle anderer Zytokine in der *H-REV107-1* Regulation zu analysieren, wurden im Rahmen einer Kollaboration humane Nierenkarzinomzelllinien getestet. Abbildung 19 zeigt die *H-REV107-1* Expression in der humanen Nierenkarzinomzelllinie MZ1257 nach Induktion mit verschiedenen Zytokinen. Die Behandlung der Zellen mit IFN- α führt zu keiner Induktion der *H-REV107-1* Genexpression. Die Behandlung der Zelllinie mit TNF- α und mit IFN- γ führt zu einer deutlichen Induktion der *H-REV107-1* Genexpression.

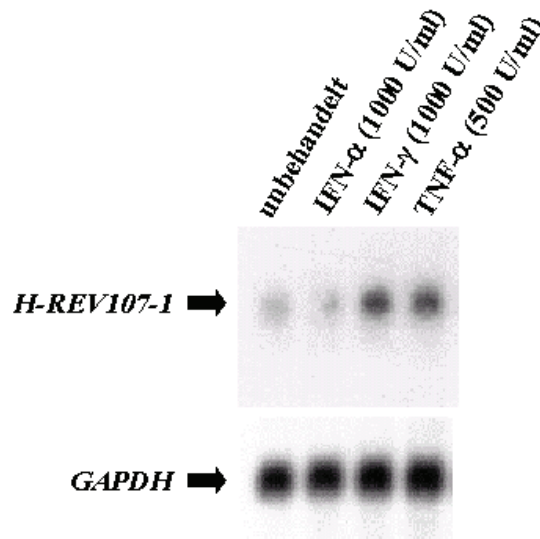


Abbildung 19: Northern Blot Analyse der *H-REV107-1* mRNA Expression in der humanen Nierenkarzinomzelllinie MZ1257. Die Zellen sind unbehandelt oder 48 Stunden mit 1000 U IFN- α , 1000 U IFN- γ bzw. 500 U TNF- α pro ml behandelt. Der Pfeil zeigt die *H-REV107-1*-spezifische mRNA. Als Ladungskontrolle dient die Northern Blot Analyse des selben Blots mit einer GAPDH Sonde.

TNF- α aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor NF κ B. Die Aktivierung der *H-REV107-1* Expression durch TNF- α ist, neben der Abhängigkeit der Expression von IFN- γ , eine weitere Information, die bei der Analyse der regulatorischen Elemente des *H-REV107-1* Promoters berücksichtigt wird. In den folgenden Schritten sollen die funktionellen Bereiche des *H-REV107-1* Promoters identifiziert und eine Verbindung zwischen diesen Bereichen und den, für die Expression des Gens verantwortlichen Signalwegen, hergestellt werden.

3.4 Klonierung des *H-REV107-1* Promoters

3.4.1 Identifizierung relevanter genomischer Bereiche aus einer Genbank

In einem ersten Schritt wird am Deutschen Ressourcenzentrum in Heidelberg eine humane Genbank mit einer *H-REV107-1*-spezifischen Sonde analysiert. Das humane Genom ist für solche Zwecke in eine Phagen Bibliothek kloniert. Jeder Einzelne dieser 19500 bp großen pPAC4 Phagen enthält ein mehrere Megabasen großes Stück humanen Genoms. Insgesamt decken diese Stücke das gesamte, humane Genom ab.

Für die Hybridisierung wird dem Ressourcenzentrum ein 387 bp großer Abschnitt der *H-REV107-1* cDNA zur Verfügung gestellt (Abb. 20). Dieser Abschnitt liegt am äußersten 5'-Ende der *H-REV107-1* cDNA, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein positiver Phagenklon nicht nur die kodierenden Bereiche des *H-REV107-1* Gens, sondern auch den dazugehörigen, oberhalb des 5'-Endes der *H-REV107-1* cDNA liegenden, Promoter beinhaltet. In einem Kolonie Hybridisierungsassay zeigen zwölf Phagen mit der H-REV107-1 Sonde ein positives Signal.

```
-404 ATTGCTGGGGCTGCAGCGCTGCCTCCGAGACCGAGAGTGGGTGGAGCGGG
-354 TCTTCCTGGAAGGGTGCAT AAGGCCGGGCGAGGTGCCTGGGATGCTTCT
-304 CCCCTTCCGCGAGGAAGAGATCTAATTGGGTAGGGCGGGTGTAGACTAGC
-254 CTGCCGAGCCGCCCGCTGGCACCTGCAGCCTCCTGGGCGGCCGCGGGCCC
-204 GGCGAGAAAGTTGTTAAAGGGAGCGAGGTGGTTGTTCTGGGGTCCGAGG
-154 CGCGCCTCTCACGCCCTGCCAACAGAAGCCGCAGTCCCGTGGGGTCTGG
-104 AGACGCAGTTTCCTTGTTAATGACAATAAATCCCTGCTCCCCCTGCCTCA
-54 GACATCTACGCAGCGAAATCGAGCCTGGCCTTGAGGGTCCACACCGCGAG
+1
-4 GAAGATGCGTGCGCCCATTCAGAGCCTAAGCCTGGAGACCTGATTGAGA
+47 TTTTTCGCCCTTTCTACAGACACTGGGCCATCTATGTTGGCGATGGATAT
+97 GTGGTTCATCTGGCCCCTCCAAGTGAGGTCGCAGGAGCTGGTGCAGCCAG
+147 TGTCATGTCCGCCCTGACTGACAAGGCCATCGTGAAGAAGGAATTGCTGT
+197 ATGATGTGGCCGGGAGTGACAAGTACCAGGTCAACAACAAACATGATGAC
+247 AAGTACTCGCCGCTGCCCTGCACGAAAATCATCCAGCGGGCGGAGGAGCT
+297 GGTGGGCGAGGAGGTGCTCTACAAGCTGACCAGTGAGAACTGCGAGCACT
+347 TTGTGAATGAGCTGCGCTATGGAGTCGCCCGCAGTGACCAGGTGAGAGAT
+397 GTCATCATCGCTGCAAGCGTTGCAGGAATGGGCTTGGCAGCCATGAGCCT
+489
+447 TATTGGAGTCATGTTCTCAAGAAACAAGCGACAAAAGCAATTAACTGAAAA
+497 AGACTGTCTGTCAGCGATGACTTTATACATCAAGGGGGTCTTGTTTTGCT
+547 AGAGAGTTTGGGGTTTGGTTTGTGGATTTTCATTGTGATTTATAATAAGGC
+597 TTATTTTACAGAATAAAATAAAGCAAAACGAGGGAGGATTTTATTGGGG
+647 GAGTGCAGCCCCAAAAAA
```

Primer 5'-3' (hu107-D): GCCTCCGAGACCGAGAGTGG

Primer 3'-5' (hu107-E): CATCTTCCTCGCGGTGTGGACCC

Startcodon: ATG +1 Endcodon: TAA +489

Abbildung 20: cDNA Sequenz des *H-REV107-1* Gens. Die Primer, die zur Herstellung der spezifischen Sonde verwendet wurden, sind in fetten Buchstaben dargestellt.

Bei einer Wiederholung der Hybridisierung zeigen in einem Southern Blot Hybridisierungsassay, nach Restriktion mit den Enzymen BamHI und NotI, fünf dieser zwölf Phagen (P1-3, P1-8, P1-10, P1-11 und P1-12) ein stark positives Signal.

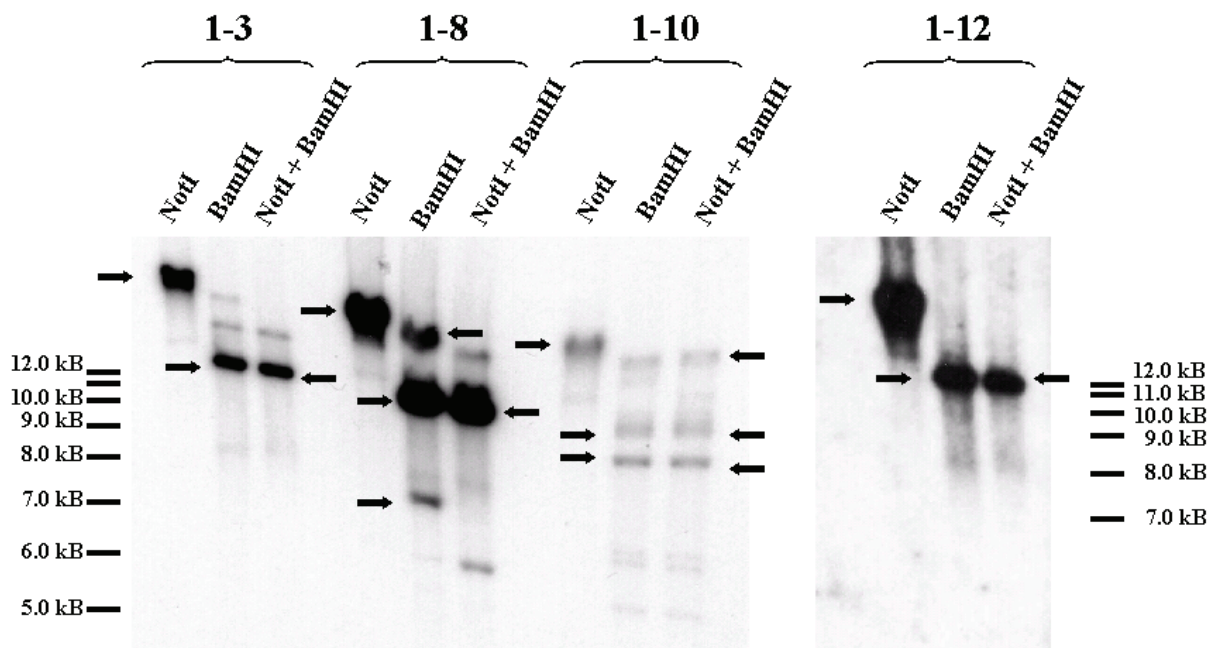


Abbildung 21: Southern Blot Hybridisierung mit der, aus den Phagen 1-3, 1-8, 1-10 und 1-12, isolierten Phagen-DNA, die vor der Hybridisierung mit den angegebenen Enzymen geschnitten wurde. Als Sonde wird ein 387 bp großes Fragment der *H-REV107-1* cDNA benutzt (Abb. 20). Die Pfeile zeigen die stark positiven DNA-Fragmente, die in einer Größenordnung von 7 kb (untere Pfeile) bis mehr als 15 kb (obere Pfeile) liegen.

Für weitere Experimente wird der Phage 1-8, der eine sehr starke Hybridisierung mit der *H-REV107-1* cDNA zeigt, ausgewählt. Um für die Subklonierung der potentiellen Promoter-DNA ein positives Fragment kleinerer Größe zu finden, wurde die Restriktion der DNA mit weiteren Enzymen wie EcoRI, XhoI, HindIII, PstI und PvuI wiederholt, und diese anschließend in einem Southern Blot Hybridisierungsassay mit der *H-REV107-1* Sonde hybridisiert. Die Restriktion mit den verschiedenen Enzymen ergibt positive DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe (Abb. 22).

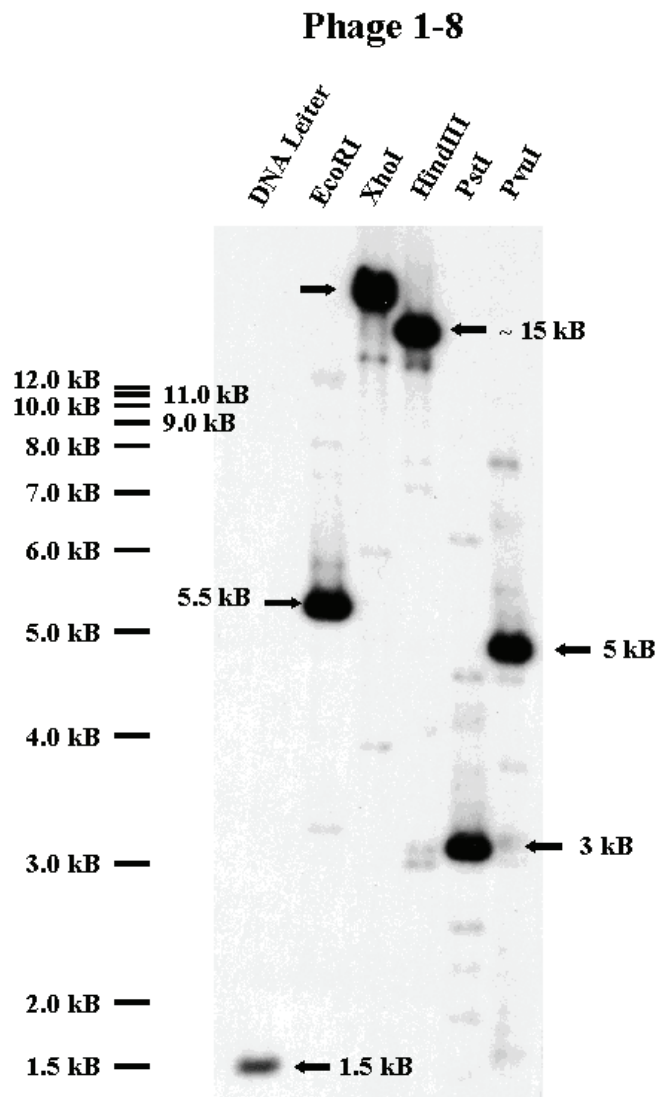


Abbildung 22: Southern Blot Hybridisierung mit der aus dem Phagen 1-8 isolierten DNA, die vor der Hybridisierung mit den angegebenen Enzymen geschnitten wurde. Als Sonde wird ein Teil der *H-REV107-1* cDNA benutzt. Die Pfeile zeigen die stark positiven DNA-Fragmente.

Das gesuchte Fragment sollte nicht zu klein sein, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die vollständige Promotersequenz enthalten ist. Ein 5.5 kb großes DNA-Fragment, das nach Restriktion des Phagen 1-8 mit dem Enzym *EcoRI* entsteht, zeigt ein deutliches Signal und wird für eine weitere Charakterisierung ausgewählt. Dazu soll es in den Vektor Bluescript II KS+ kloniert werden.

3.4.2 Klonierung der *H-REV107-1* positiven DNA Fragmente in den Vektor Bluescript II KS+ (Stratagene)

Das mit EcoRI geschnittene DNA-Fragment wird aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten, mit Hilfe des QiaExII Kits (Qiagen) aus der Agarose isoliert und aufgereinigt. Eine Probe dieser DNA wird in einem erneuten Southern Blot Hybridisierungsassay überprüft, um sicherzustellen, dass aus der Vielfalt der Fragmente das Richtige isoliert wurde.

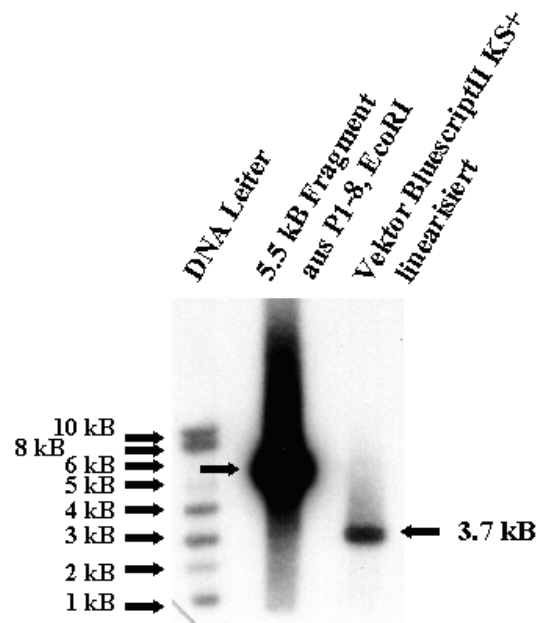


Abbildung 23: In einem Southern Blot Hybridisierungsassay wird mit Hilfe der *H-REV107-1* Sonde überprüft, ob die zuvor aus dem „low-melting“ Agarose Gel isolierte DNA-Bande das *H-REV107-1* Gen enthält. Der linke Pfeil zeigt das stark positive Signal des zuvor aus dem Phagen P1-8 isolierten, ca. 5.5 kB großen DNA-Fragments. Der rechte Pfeil zeigt im Vergleich dazu die 3.7 kb große DNA-Bande des linearisierten Bluescript II KS+ Vektors, die ebenfalls ein positives Signal zeigt.

Das aus dem Phagen isolierte, 5.5 kB große DNA-Fragment wird nun in den ebenfalls mit EcoRI geschnittenen Vektor BluescriptII KS+ kloniert. Das Konstrukt wird in *E.coli* Ultracompetente XL-2 blue bzw. *E.coli* SURE2 Bakterien transformiert, Klone werden kultiviert und die Konstrukte aus diesen isoliert. Die isolierte DNA wird zur Kontrolle mit EcoRI geschnitten und die Proben in einem weiteren Southern Blot Hybridisierungsassay untersucht. Abbildung 24 zeigt eine Auswahl positiver Klone mit einem Fragment der Größe 5.5 kB. Unterhalb der 5.5 kB großen Bande sieht man die 3.7 kB große Bande des linearisierten Vektors. Ganz links ist zum Vergleich das 5.5kB große Original-Fragment aufgetragen, das aus dem Phagen P1-8 isoliert wurde. Auffällig ist hierbei die vergleichsweise schwache, spezifische Hybridisierung des subklonierten Fragments im Vergleich zur Hybridisierung des isolierten Fragments und dem Hintergrund-Signal des Vektors.

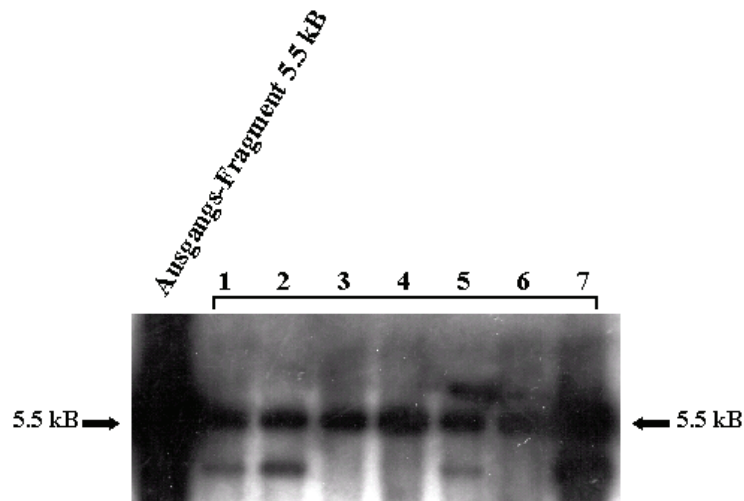


Abbildung 24: In einem Southern Blot Hybridisierungsassay werden die Bluescript KS+ Plasmide, die ein subkloniertes *H-REV107-1* Fragment enthalten, nach Verdau mit EcoRI, mit der H-REV107-1 Sonde hybridisiert. Der linke Pfeil zeigt die zum Vergleich aufgetragene, 5.5 kb große Ausgangs-DNA. 1-7 sind positive, mit EcoRI verdaute Bluescript Klone.

Die aus den positiven Klonen isolierte DNA, die aus dem Vektor Bluescript II KS+ und einem *H-REV107-1* spezifischen Insert bestehen soll, wird sequenziert. Die klassische Sequenzierung (SequiTherm EXCEL2, Primer M13 fwd, M13 rev, hrev107fwd, H-rev107 5'-rev) ergibt stets eine durcheinandergewürfelte Sequenz, die nur fragmentweise mit der Sequenz der Datenbank (HTGS, NCBI) übereinstimmt.

3.4.3 Vergleich der Restriktionsprodukte des Phagen P1-8 mit den Restriktionsprodukten genomischer Gesamt-DNA

Offenbar liegt nach der Subklonierung in Bluescript *H-REV107-1* DNA vor, jedoch nicht in der Sequenzabfolge, wie auf Grund der Sequenz aus der Datenbank, erwartet. Dabei ist unklar, ob bereits die genomischen Fragmente der Bakteriophagen bei der Herstellung der Genbank im Ressourcenzentrum in Heidelberg durch Rekombination durcheinandergeraten sind. Deshalb wird mittels Southern Blot Analyse ein Restriktionsvergleich der genomischen DNA aus menschlichen Lymphozyten und der DNA aus den Bakteriophagen durchgeführt. Bei allen Proben sollte die H-REV107-1 Sonde eine gleich große Bande markieren. Abbildung 25 zeigt, dass die genomische DNA der vom Ressourcenzentrum isolierten Bakteriophagen offenbar der DNA aus den Lymphozyten entspricht. Die drei DNA-Proben aus den Lymphozyten zeigen nach Restriktion mit PstI bzw. mit EcoRI jeweils ein positives Signal auf gleicher Höhe wie die, mit den selben Enzymen geschnittene, DNA des Phagen. Auf Grund der Konzentrationsunterschiede zeigen die positiven Fragmente der, aus den menschlichen Lymphozyten gewonnenen, genomischen Proben (RF-1, MCF-1 und C4-1) ein sehr schwaches Signal, das auf dem Original-Blot aber gut erkennbar ist. Die Konzentrationsunterschiede ergeben sich aus dem erheblichen Größenunterschied zwischen dem humanen Gesamt-Genom und dem nur einige Megabasen „kleinen“ DNA-Fragment, das in den Bakteriophagen kloniert wurde.

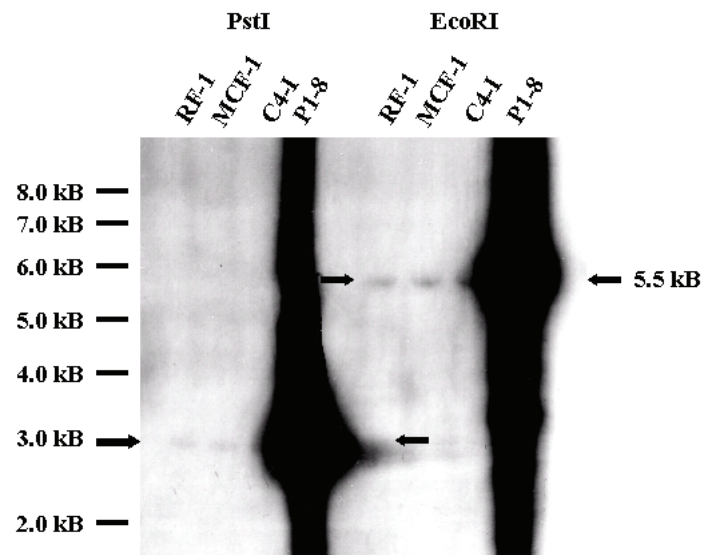


Abbildung 25: In einem Southern Blot Hybridisierungsassay werden die, mit je einem Restriktionsenzym geschnittenen, verschiedenen Proben humaner Gesamt-DNA und die DNA des Phagen P1-8 mit der H-REV107-1 Sonde hybridisiert. Die Pfeile zeigen die, jeweils gleich großen, positiven Signale der verschiedenen Proben.

In einer zweiten Sequenzierungsstrategie wird das „Genome Priming System“-Kit benutzt, bei dem mit Hilfe einer Transposase Primer-Bindungsstellen mit einer zufälligen Verteilung in den zu sequenzierenden Klon eingeführt werden. Durch Sequenzierung einer genügend hohen Anzahl an Klonen erreicht man eine vollständige Überlappung der Sequenzfragmente, die computergestützt zu einer Gesamtsequenz zusammengesetzt werden. Auch die hier resultierende Sequenz deckt sich nur bruchstückhaft mit der Sequenz aus den Datenbanken.

Das Durcheinanderwürfeln bzw. Einfügen von Deletionen in die zu replizierende, eukaryontische DNA durch das *E.coli* Reparatursystem ist ein bekanntes Problem (Joyce, 1992). Eukaryontische DNA besitzt häufig sekundäre Strukturen, wie z.B. Z-DNA, oder es kommt zur Bildung einer kreuzförmigen DNA-Struktur, die von inversen Sequenzwiederholungen herrührt. Diese sekundären Strukturen werden von den Bakterien durch verschiedene Mechanismen verändert. Das UV Reparatursystem (*uvrC*) und das SOS Reparatursystem (*umuC*) sind beide in der Reparatur der DNA involviert. Beide Gene wurden aus dem Genom des Bakterienstamms *E.coli* SURE® entfernt, was in einer 10-20fachen Zunahme der Stabilität inverser Wiederholungen in eingeführter DNA resultiert. Die Mutation der Gene *sbcC* und *recJ*, die eine Rolle in der Rekombination von DNA spielen, führt zu einer Zunahme der Stabilität von Z-DNA Strukturen. Die zusätzliche Mutation des Gens *recB* vermindert die homologe Rekombination in großem Maße und führt zu einem Rekombinations-defizienten Phänotyp (<http://www.stratagene.com/products/>).

Trotz der Verwendung der *E.coli* SURE® 2 Bakterien wurde die inserierte Sequenz durcheinandergewürfelt. Der Grund hierfür kann die, im zu klonierenden Promoterbereich liegende Alu-Sequenz sein. Diese inverse Sequenz der humanen Alu-Sc Unterfamilie befindet sich zwischen den Basen –999 und –716 und ist in der Abbildung 26 durch fette Buchstaben markiert. Die repetitiven Alu-Sequenzen finden sich über das gesamte humane Genom verteilt.

Auf Grund dieser Schwierigkeit, soll jetzt mit Hilfe der PCR der *H-REV107-1* Promoter direkt aus der genomischen DNA amplifiziert werden. Dazu muss die Promotersequenz möglichst genau identifiziert werden.

3.5 Bestimmung regulatorischer Bereiche im *H-REV107-1* Promoter

3.5.1 *in silico* Bestimmung der Promotersequenz

Im Rahmen des „Humanen Genom Projektes“ wurde mittlerweile der Chromosomenabschnitt 11q12.3, auf dem sich das *H-REV107-1* Gen befindet, sequenziert. Dadurch ist es möglich, den entsprechenden Sequenzbereich mit Hilfe des 5'-Endes der *H-REV107-1* cDNA in der „High Throughput Genome Sequences“ (HTGS) Datenbank von NCBI zu identifizieren. Die der Datenbank entnommene Sequenz wird mit Hilfe spezieller Software weiter analysiert.

Dazu werden 1085 Basenpaare der genomischen Sequenz 5'-aufwärts des 1.Exons sowie 419 Basenpaare des 1.Exons mit den Promoteranalyse-Programmen FirstEF, ConPro und McPromoter untersucht. Des weiteren vergleicht das Programm PromoterInspector die Sequenz der *H-REV107-1* cDNA mit der genomischen Sequenz aus einer internen Datenbank. Es untersucht hierbei einen Sequenzbereich, der 29 kB groß ist und sowohl 5' als auch 3' des ersten Exons von *H-REV107-1* liegt.

Die Programme FirstEF, ConPro und PromoterInspector definieren potentielle Promoterbereiche. McPromoter definiert einen Bereich für potentielle Transkriptionsstartpunkte. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 26 zusammengefasst. Der von FirstEF vorgeschlagene Promoterbereich liegt zwischen den Basenpaaren – 873 und – 1442 und umfasst 569 Basen (Bereich zwischen den Pfeilen # 1). Der von ConPro vorgeschlagene Promoterbereich umfasst 599 Basenpaare, beginnt bei Basenpaar - 1027 (Pfeil # 2) und endet beim von ConPro vorgeschlagenem, Transkriptionsstartpunkt (Pfeil # 4). Innerhalb des gesamten 29 kB großen Bereichs, der von PromoterInspector untersucht worden ist, wird nur ein potentieller Promoter identifiziert. Er liegt zwischen den Basen – 376 bis – 627 5' des *H-REV107-1* Startcodons ATG (Bereich zwischen den Pfeilen # 3).

Die Programme ConPro und McPromoter definieren auch potentielle Transkriptionsstartpunkte (Pfeil # 4 ConPro; Pfeil # 5 McPromoter). Diese liegen alle in unmittelbarer Nähe der Startbase des längsten, experimentell gefundenen *H-REV107-1* cDNA Klons 12-1 (Pfeil # 7). Neben diesem Klon 12-1, dessen Startpunkt beim Basenpaar -404 liegt, wurden noch weitere cDNA Klone experimentell gefunden (Husmann, Sers, nicht veröffentlichte Daten). Der Klon 3-1 beginnt bei -212, der Klon 9-1 bei –16 (Abb. 27).

Die japanische Datenbank DataBaseTSS (DBTSS; URL:<http://dbtss.hgc.jp/index.html>; Suzuki et al., 2002) zeigt einen, mit der Methode der Oligo-Capped PCR experimentell ermittelten, maximalen TSP für *H-REV107-1* (Pfeil # 6) (Suzuki und Sugano, 2003). In den meisten Experimenten werden die cDNA-Klone durch eine Erst-Strang PCR vom 3'-Ende des Gens aus synthetisiert, da man an diesem Ende das poly-A Signal des Gens als Bindungsstelle für den Synthese-Primer benutzen kann. Der genaue 5'-Startpunkt des Gens kann so jedoch nicht ermittelt werden, da die Strangsynthese oft vorher abbricht und es keine universelle Primerstelle gibt, die eine Erst-Strang Synthese vom 5'-Ende des Gens erlauben würde. Die Methode der Oligo-Capped PCR schützt das 5'-Ende der mRNA und verlängert es um eine Primer-Bindungsstelle. Dies erlaubt eine vollständige Synthese der cDNA vom 5'-Ende des Gens. Der so ermittelte Startpunkt liegt 15 Basen 5' des Startpunktes der längsten, verfügbaren *H-REV107-1* cDNA.

Alle *in silico* ermittelten Ergebnisse weisen daraufhin, dass der als Promoterbereich vermutete Sequenzbereich den Promoter des *H-REV107-1* Gens enthält. Allerdings werden durch die Programme PromoterInspector und FirstEF zwei sich nicht überlappende Bereiche vorgeschlagen. Da die Methode der Oligo-Capped PCR das experimentell verlässlichste Ergebnis liefert und sich dieses gut mit den eigenen experimentellen Daten deckt, wird der hier ermittelte, maximale Transkriptionsstartpunkt (DBTSS) übernommen. Vermutlich hat *H-REV107-1* aber mehrere Transkriptionsstartpunkte. Dies soll mit der Methode der Primer Extension überprüft werden.



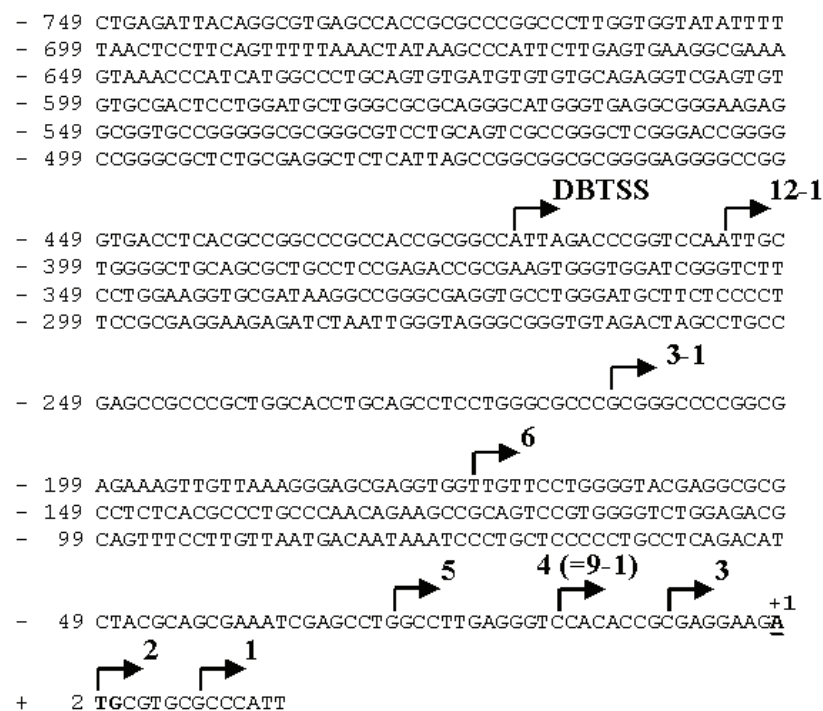
Abbildung 26: Schematische Darstellung potentieller H-REV107-1 Promoterbereiche und Transkriptionsstartpunkte nach *in silico* Analyse Von verschiedenen Promoteranalyse – Programmen vorgeschlagene, potentielle Promoterbereiche und Transkriptionsstartpunkte (TSP), sowie die in der NCBI Datenbank "alu" identifizierte Alu-Sequenz. Pfeile: 1) FirstEF (Promoterbereich), 2) ConPro (Promoterstartpunkt), 3) PromoterInspector (Promoterbereich), 4) ConPro (TSP), 5) McPromoter (TSP-Bereich), 6) DataBaseTSS (TSP), (7) 12-1 cDNA (TSP). Fett gedruckt: bp -716 bis -999 (Alu-Sequenz).

3.5.2 Analyse der Transkriptionsstartpunkte

Die Klonierung des *H-REV107-1* Gens hat zu mehreren cDNA-Klonen geführt. Diese tragen die Bezeichnung 12-1, 3-1 und 9-1. Der längste dieser Klone ist der Klon 12-1. Mit Hilfe der radioaktiven Primer Extension wird versucht, einen oder mehrere Transkriptionsstartpunkte festzulegen. Dabei wird mit einem 3'- 5' gerichtetem Primer eine PCR aus der *H-REV107-1* mRNA durchgeführt. Die amplifizierte DNA trennt man auf einem Polyacrylgel auf. Auf einer parallel aufgetragenen Sequenzleiter lässt sich dann die Größe der PCR-Produkte ablesen.

Diese Analyse zeigt wie erwartet eine Reihe von Transkriptionsstartpunkten für H-REV107-1. Die Startpunkte, die anhand der Sequenz eindeutig identifizierbar sind, sind in der Abbildung 27 eingetragen und tragen die Nummern 1-6. Die Nummer 4 entspricht dabei dem Startpunkt des cDNA-Klons 9-1. Keiner der gefundenen Startpunkte entspricht der Größe des Klons 12-1 oder dem Ergebnis aus der Datenbank DBTSS, aber alle liegen innerhalb eines 428 bp großen Bereichs.

Um den H-REV107-1 Promoter noch genauer eingrenzen zu können werden die Bereiche 5' der beiden längsten Transkripte (DBTSS, 12-1) auf mögliche Core Promoter Elemente hin analysiert.



1 – 6: TSP aus Primer Extension

9-1, 3-1, 12-1: cDNA Klone

DBTSS: TSP aus oligocapped-Datenbank

Abbildung 27: Schematische Darstellung verschiedener, experimentell bestimmter, Transkriptionsstartpunkte des *H-REV107-1* Gens. 9-1, 3-1 und 12-1 zeigen die Startpunkte der cDNA-Klone, die Nummern 1–6 die Ergebnisse der Primer Extension und DBTSS den Startpunkt des längsten Klons aus der DBTSS-Datenbank.

3.5.3 Bestimmung von *H-REV107-1* Core Promoter Elementen

Der Core Promoter eines Gens ist als der Bereich definiert, an den sich der basale Transkriptions-Komplex der RNA PolymeraseII anlagert und der ausreicht, um eine korrekte Transkription zu initiieren. Jeder Signalweg, der über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression eines Gens führt, verläuft letztlich über den RNA PolymeraseII-Komplex. Dabei kommt diesem keine statische, sondern eine dynamische Rolle bei der Regulation der Genexpression zu.

Der Core Promoter Bereich umfasst ca. 70 Basenpaare (– 35 bp bis + 35 bp) 5' und 3' des Transkriptionsstartpunktes (Butler und Kadonaga, 2002). In diesem Kapitel 1.6.3 folgt die Nummerierung der DNA-Sequenz der Nomenklatur für Core Promoter Elemente. Das bedeutet, dass nicht die Base A des Startcodon ATG als +1 gezählt wird, wie es bei der Nummerierung der genomischen Sequenz üblich ist. Bei der Positionsbeschreibung der Core Promoter Elemente wird der Transkriptionsstartpunkt als +1 bezeichnet, da sich der Abstand und die Funktion der Core Promoter Elemente auf diesen Startpunkt beziehen. Im Gegensatz dazu befindet sich das ATG Triplet des Translationsstartpunktes bei jedem Gen in einer anderen Entfernung zum Transkriptionsstartpunkt und den zugehörigen Core Promoter Elementen.

Innerhalb dieses 80 bp großen Bereichs befinden sich verschiedene Elemente, die in verschiedenen Promotoren in variablen Kombinationen vorhanden sein können. Dazu gehört die TATA-Box, das Initiator Element (Inr), das "TFIIB-Recognition Element" (BRE), das "Downstream Core Promoter Element" (DPE), das CT-Signal, das "Motif Ten Element" (MTE) und das "Downstream Core Element" (DCE).

Die TATA-Box befindet sich meist ca. 25 – 30 Basenpaare 5' vom Transkriptionsstartpunkt (TSP), besitzt die Consensus-Sequenz TATAAA, wobei ein bis zwei Abweichungen von dieser Sequenz die Funktion nicht beeinträchtigen müssen und wird vom TATA-Box bindenden Protein (TBP) gebunden (Singer et al., 1990). Das Element BRE schließt sich, falls vorhanden, direkt 5' an die TATA-Box an und wird vom Faktor TFIIB sequenzspezifisch gebunden. Die Consensus-Sequenz lautet (G/C)-(G/C)-(G/A)-CGCC. Interessanterweise wurde für BRE und die Bindung des Faktors TFIIB sowohl eine Aktivierung als auch eine Repression der Genexpression gezeigt (Lagrange et al., 1998; Evans et al., 2001). Das Inr-Element ist neben der TATA-Box das zweite Element, das zu einer genauen Lokalisation der RNA Polymerase II Maschinerie führt und so den TSP festlegt. Die Consensus-Sequenz lautet (C/T)-(C/T)₋₁-A₊₁-N-(T/A)-(C/T)-(C/T), wobei die häufiger zu findende Base C an Position –1 und die Startbase A (+1) das CAP-Signal bilden. Hauptsächlich bindet der TFIID-Komplex an das Inr-Element, wobei die Untereinheiten TAF_{II}150 und TAF_{II}250 mit der DNA interagieren (Chalkley und Verrijzer, 1999). Das CT-Signal liegt direkt 3' vom Inr-Element im Sequenzbereich +6 bis +12 und wurde durch bioinformatische Sequenzanalysen identifiziert (Larsen et al., 1995). Die Consensus-Sequenz lautet C-T-N-C-N-G. Über die Bedeutung des CT-Signals liegen noch keine experimentellen Daten vor. Das Downstream Promoter Element (DCE) liegt genau +28 bis +32 vom Transkriptionsstartpunkt. Bereits eine Base mehr oder weniger zwischen dem DPE und dem TSP führt zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des Elements. Die Consensus-Sequenz lautet (A/G)₊₂₈-G-(A/T)-(C/T)-(G/A/C). Dazu kommt eine geringfügige Präferenz für die Base G an Position +24 (Kutach und Kadonaga, 2000). In einem DPE-abhängigen Promoter kann das Element aber nicht allein, sondern nur in Zusammenhang mit dem Inr-Element gesehen werden. Der Grund hierfür, sowie für den unbedingt notwendigen Abstand von 28 Basen zum Transkriptionsstartpunkt, ist, dass auch DPE von den Untereinheiten TAF_{II}60 und TAF_{II}40 des TFIID-Komplex gebunden wird (Burke und Kadonaga, 1997). Ein

weiteres Element ist das "Multiple Start Site Element Downstream" (MED-1). Dieses Motiv soll für multiple Startpunkte innerhalb eines 5' von ihm liegenden Bereichs verantwortlich sein. Die Consensus-Sequenz lautet GCTCCC. Im Promoter des P-Glykoproteingens führt die Mutation des Elements zu einer Verminderung der Expression und zu einer Reduktion der Transkriptionsstartpunkte (Ince und Scotto, 1995). Im Thymidylat Synthase Promoter der Maus konnte kein Einfluss des Elements auf die Transkription des Gens gezeigt werden (Rudge und Johnson, 1999).

Das *H-REV107-1* Gen besitzt verschiedene Startpunkte. Zunächst wird die Region um die beiden längsten Transkriptionsstartpunkte DBTSS und 12-1 auf das Vorhandensein der beschriebenen Elemente untersucht. Dazu werden zuerst die Initiator-Elemente der beiden Transkripte an Hand ihrer Sequenz identifiziert. Die weiteren Elemente werden auf Grund ihres in der Literatur beschriebenen Abstands zum Initiator-Element identifiziert. Dies führt für die Transkripte DBTSS und 12-1 zu einem interessanten Ergebnis (Abb. 28). Beide Transkripte besitzen eine eigene Startbase +1 innerhalb ihres Initiator-Elements. Diese liegen in einem Abstand von 14 Basenpaaren zueinander. Daher führen die, für die einzelnen Elemente in der Literatur definierten, Abstände zwischen der Startbase und dem jeweiligen Element zu unterschiedlichen Sequenzbereichen. Deswegen ergeben sich für die beiden Transkripte zwei unterschiedlich aufgebaute, potentielle Core Promotoren.

Dies zeigt sich z.B. bei dem Element DPE. Das Transkript DBTSS besitzt dieses Element im definierten Abstand +28. Die Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz beträgt 60%, zuzüglich der Übereinstimmung mit der Base G an Position +24. Dies würde den Promoter als einen Inr-DPE Promoter klassifizieren. Die Sequenz, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt 12-1, enthält kein DPE-Element. Dafür befindet sich hier ein CT-Signal, im, in der Literatur definierten, Bereich +6 bis +11, wobei fünf von sechs Basen der Consensus-Sequenz entsprechen. Dieses Signal lässt sich nicht im Abstand zum Transkriptionsstartpunkt DBTSS finden.

Die 5' des Inr-Elements liegenden Elemente können für beide Transkriptionsstartpunkte aufgeführt werden, da für diese keine festen Abstände zur Startbase definiert sind. Obwohl das *H-REV107-1* Gen keine TATA-Box besitzt, kommt das Element BRE vor. Dieses Element soll sich direkt 5' der TATA-Box anschließen und wird vom Faktor TFIIB gebunden. Im Fall des *H-REV107-1* Promoters kommt dieses Element doppelt, direkt aufeinander folgend vor, wobei in beiden Elementen sechs der sieben Basen der Consensus-Sequenz entsprechen. Dies wurde bisher noch für keinen Promoter beschrieben.

Die TATA-Box liegt stets 5' im Bereich -25 bis -30 von der Startbase +1. Diese TATA-Box kann in synthetischen Promotoren durch andere Elemente substituiert werden, wie es für SP-1, AP-1, ATF (Mitglied der CREB-Familie) und TEF-1 gezeigt wurde (Conaway und Conaway, 1991). Im Fall des Transkripts mit dem Startpunkt DBTSS befindet sich in diesem Bereich eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor der CREB-Familie. Dieser könnte die Funktion der TATA-Box übernehmen, wobei das anschließende, doppelt vorkommende BRE-Element 3' von dieser Bindungsstelle folgen würde.

Core Promoter Elemente im Fall des Transkriptionsstartpunktes DBTSS

```

- 80 CCGGGCGCTCTGCGAGGCTCTCAT TAGCCGGCGGCGCGGGAGGGGCCGG
                                DBTSS
                                ↗
- 30 GTGAOCTCACGCCGGCCCGCCACCGCGGCCATTAGACCCGGTCCAATTGC
    CREB  BRE    BRE          +1 Inr
                                ↗
+ 21 TGGGGCTGCAGCGCTGCCTCCGAGACCGCGAAGTGGGTGGATCGGGTCTT
    +24 +28 +32
    DPE

+ 71 CCTGGAAGGTGCGATAAGGCCGGGCGAGGTGCCTGGGATGCTTCTCCCT
+ 121 TCCGCGAGGAAGAGATCTAATTGGGTAGGGCGGGTGTAGACTAGCCTGCC
+ 171 GAGCCGCCCGCTGGCACCTGCAGCCTCCTGGGCGCCCGGGGCCCGGGCG
+ 221 AGAAAGTTGTTAAAGGGAGCGAGGTGGTGTTCCTGGGGTACGAGGCGCG
+ 271 CCTCTCACGCCCTGCCCAACAGAAGCCGAGTCCGTGGGGTCTGGAGACG

+ 321 CAGTTTCCTTGTTAATGACAATAAATCCCTGCTCCCCCTGCCTCAGACAT
                                MED-1
+ 371 CTACGCAGCGAAATCGAGCCTGGCCTTGAGGGTCCACACCGCGAGGAAGA
+ 421 TGCCTGCGCCCAT
  
```

Core Promoter Elemente im Fall des Transkriptionsstartpunktes 12-1

```

- 94 CCGGGCGCTCTGCGAGGCTCTCAT TAGCCGGCGGCGCGGGAGGGGCCGG
                                12-1
                                ↗
- 44 GTGAOCTCACGCCGGCCCGCCACCGCGGCCATTAGACCCGGTCCAATTGC
    CREB  BRE    BRE          +1 +6
                                Inr
                                ↗
+ 7 TGGGGCTGCAGCGCTGCCTCCGAGACCGCGAAGTGGGTGGATCGGGTCTT
    CT-Signal

+ 57 CCTGGAAGGTGCGATAAGGCCGGGCGAGGTGCCTGGGATGCTTCTCCCT
+ 107 TCCGCGAGGAAGAGATCTAATTGGGTAGGGCGGGTGTAGACTAGCCTGCC
+ 157 GAGCCGCCCGCTGGCACCTGCAGCCTCCTGGGCGCCCGGGGCCCGGGCG
+ 207 AGAAAGTTGTTAAAGGGAGCGAGGTGGTGTTCCTGGGGTACGAGGCGCG
+ 257 CCTCTCACGCCCTGCCCAACAGAAGCCGAGTCCGTGGGGTCTGGAGACG

+ 307 CAGTTTCCTTGTTAATGACAATAAATCCCTGCTCCCCCTGCCTCAGACAT
                                MED-1
+ 357 CTACGCAGCGAAATCGAGCCTGGCCTTGAGGGTCCACACCGCGAGGAAGA
+ 407 TGCCTGCGCCCAT
  
```

Abbildung 28: Schematische Darstellung potentieller Core Promoter Elemente für die Transkriptionsstartpunkte DBTSS und 12-1. Die Nummerierung bezieht sich in dieser Abbildung auf die jeweilige Base A des Transkriptionsstartpunkts. Die Base 5' der Startbase erhält die Bezeichnung -1. CREB (Bindungsstelle für einen Faktor der CREB-Familie), BRE (TFIIB Recognition Element), Inr (Initiator Element, beinhaltet das CAP-Signal CA [-1,+1]), CT-Signal, DPE (Downstream Promoter Element) und MED-1 (Multiple Start Site Element Downstream)

Die unterschiedliche Anordnung von Core Promoter Elementen um die Initiator-Elemente der beiden *H-REV107-1* Transkripte DBTSS und 12-1 kann eine wichtige Rolle in der Regulation des Gens spielen. Das Vorhandensein zweier Core Promotoren inklusive zweier Initiator Elemente kann zum Aufbau zweier, verschiedener RNA Polymerase II Komplexe führen. Diese könnten wiederum durch die Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren unterschiedlich gut stabilisiert werden. Die Stabilität des RNA Polymerase II Komplexes ist ein Kriterium, welches das Expressionsniveau eines Gens bedingt. Die Regulation des *H-REV107-1* Gens könnte so zum Beispiel gewebespezifisch durch das Angebot verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Augenmerk auf dem regulatorischen Bereich des proximalen *H-REV107-1*-Promoters liegen. Dieser schließt sich 5' des Core-Promoters an und beinhaltet die Bindungsstellen für die, von Signalwegen aktivierten, Transkriptionsfaktoren.

3.5.4 *in silico* Analyse der Transkriptionsfaktorenbindungsstellen

In der weiteren Bezeichnung der Sequenz bezieht sich die Nummerierung der Basen wieder auf das Startcodon ATG. Der Bereich 1085 Basenpaare 5' des ATG und 419 Basenpaare des 1.Exons enthält mit größter Wahrscheinlichkeit den *H-REV107-1* Promoter und wird für die weitere Analyse verwendet. Die Sequenz des Promoters wird mit Hilfe der Software MatInspector von Genomatix (<http://www.genomatix.de>) analysiert. Diese vergleicht die zu untersuchende Sequenz mit einer Transkriptionsfaktoren-Datenbank, in der die Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren gespeichert sind.

Eine Bindungssequenz setzt sich aus der Kern-Sequenz (Core) und der Matrix-Sequenz zusammen. Eine Kern-Sequenz ist das Basenmotiv, an das der Transkriptionsfaktor bindet und wird in der folgenden Tabelle mit großen Buchstaben dargestellt. Die Basen, die die Kern-Sequenz umgeben, bilden die Matrix-Sequenz. Da zwischen dem bindenden Transkriptionsfaktor und den umgebenden Basen Wechselwirkungen stattfinden, sind auch diese Basen von Bedeutung. Alle Basen, die für die Analyse einen hohen Informationswert besitzen, werden in der Tabelle in fetten Buchstaben dargestellt. Das sind meistens alle Basen des Kernelements, aber oft auch Basen aus der Matrix-Sequenz. Für die Bestimmung des Gewichtungsfaktors der Core- oder der Matrix-Sequenz ist dabei entscheidend, wie häufig in bereits *in vivo* nachgewiesenen Bindungsstellen die jeweilige Base im selben Abstand 5' oder 3' zu den anderen Basen vorkommt. Ist zum Beispiel bei allen *in vivo* bestätigten IRF-1-Bindungsstellen die Base A in einem Abstand von drei Basen 5' zur Kern-Sequenz zu finden, so bedeutet dies für jede Base A einer zu untersuchenden Sequenz, die ebenfalls in drei Basen Abstand in 5'-Richtung von einem IRF-1-Element gefunden wird den maximalen Gewichtungsfaktor 1.0. Aus diesen Häufungen ergibt sich für die Kern- bzw. die Matrix-Sequenz ein Wert für die Übereinstimmung der in der Datenbank beschriebenen Sequenzen mit der untersuchten Promotersequenz.

Von besonderem Interesse sind die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen, deren Transkriptionsfaktoren Ziele von Signalwegen sind, die die Regulation von *H-REV107-1*, entsprechend der vorangegangenen Analyse, mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflussen, z.B. ISRE/IRF und STAT-1 im Fall von IFN- γ , sowie cRel (eine Untereinheit von NF κ B) im Fall von TNF- α .

Tabelle 14: Potentielle Transkriptionsfaktorenbindungsstellen im Bereich von -335 bis -997 vom Translationsstartpunkt der *H-REV107-1* Promotersequenz. (Die Bezeichnung #1 und #2 im Falle von cRel und CCAAT stammt nicht aus der Datenbank, sondern dient der Übersichtlichkeit.)

Name	Sequenz	Orientierung	Core	Matrix
IRF-1/IRF-2/ISRE	aacaaagcGAAActcagtc	-	1.000	0.913
Activator Protein 4 (AP-4)	ttagcCAGCatgtctct	+	1.000	0.818
Activator Protein 1 (AP-1)	ctTGACctcgt	+	1.000	0.889
GC-Box	cgcggGGAGggggccg	+	0.876	0.940
CRE-Binding Protein (CREBP)	gccgggTGACctcacgccgc	+	1.000	0.837
CCAAT-Box #1	cgcggCCATtag	+	0.856	0.862
CCAAT-Box #2	ccggtCCAAttg	+	1.000	0.860
cRel #1	atcgggtcTTCCtgg	+	1.000	0.942
Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)	gggtcttctGGAAGgtgc	+	1.000	0.951
cRel #2	atcgaccTTCCagg	-	1.000	0.805

Nach Abschluss der *in silico* Identifizierung der Promotersequenz, der Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte, sowie der Analyse potentieller Core Promoter Elemente und Transkriptionsfaktorbindungsstellen, sollen die funktionellen Bereiche des Promoters *in vitro* identifiziert werden. Dazu wird zuerst die Promotersequenz in ein Reporterplasmid kloniert, um anschließend den Promoter in Reporter Assays zu charakterisieren.

3.6 Analyse des *H-REV107-1* Promoters mittels Reporter Assay

3.6.1 Klonierung des *H-REV107-1* Promoters in den SEAP Reportersystem-Vektor

Die in der Datenbank „High Throughput Genome Sequences“ des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) identifizierte, 5' der *H-REV107-1* cDNA liegende Sequenz soll mittels PCR amplifiziert werden. Dazu werden Primer gewählt, die ein 980 Basenpaare großes DNA-Fragment umschließen, das mit dem 5'-Ende der *H-REV107-1* cDNA um 403 Basenpaare überlappt (Primer A ; Primer 4, Abb. 29). Auf Grund der außergewöhnlich AT-reichen Sequenz 5' des Primers A ist es nicht möglich, diesen weiter in 5' Richtung zu verschieben.

Der Primer A und der Primer 4 werden um die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Kpn1 und EcoR1 verlängert. Mit diesen Primern wird mittels PCR aus der genomischen DNA des Phagen P1-8 ein DNA-Fragment amplifiziert. Die an den Enden eingebauten Schnittstellen werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und das Fragment in den SEAP 2 basic Vektor (Clontech) ligiert.

Aus diesem DNA Abschnitt werden mit den 5'→3' Primern B, C, D und dem 3'→5' Primer 2 noch weitere, verkürzte DNA Abschnitte amplifiziert. Wie aus der Abbildung 29 ersichtlich ist, werden diese weiteren Primer so gelegt, dass durch die Sequenzverkürzung potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen wegfallen. So liegt der Primer B 3' von der ISRE/IRF-1-Bindungsstelle und der Primer D 3' der beiden AP-Bindungsstellen. Insgesamt werden fünf verschiedene Konstrukte hergestellt, deren Sequenz mittels Sequenzierung bestätigt wird.

Diese Strategie führt direkt zur Herstellung der beschriebenen Promoterkonstrukte. Diese Sequenz ist kürzer als die aus dem Phagen isolierte, 5.5 kB große Sequenz ist und enthält vermutlich nicht alle notwendigen Bereiche, die zur Aktivierung der Rekombinationereignisse in den Bakterien benötigt werden.

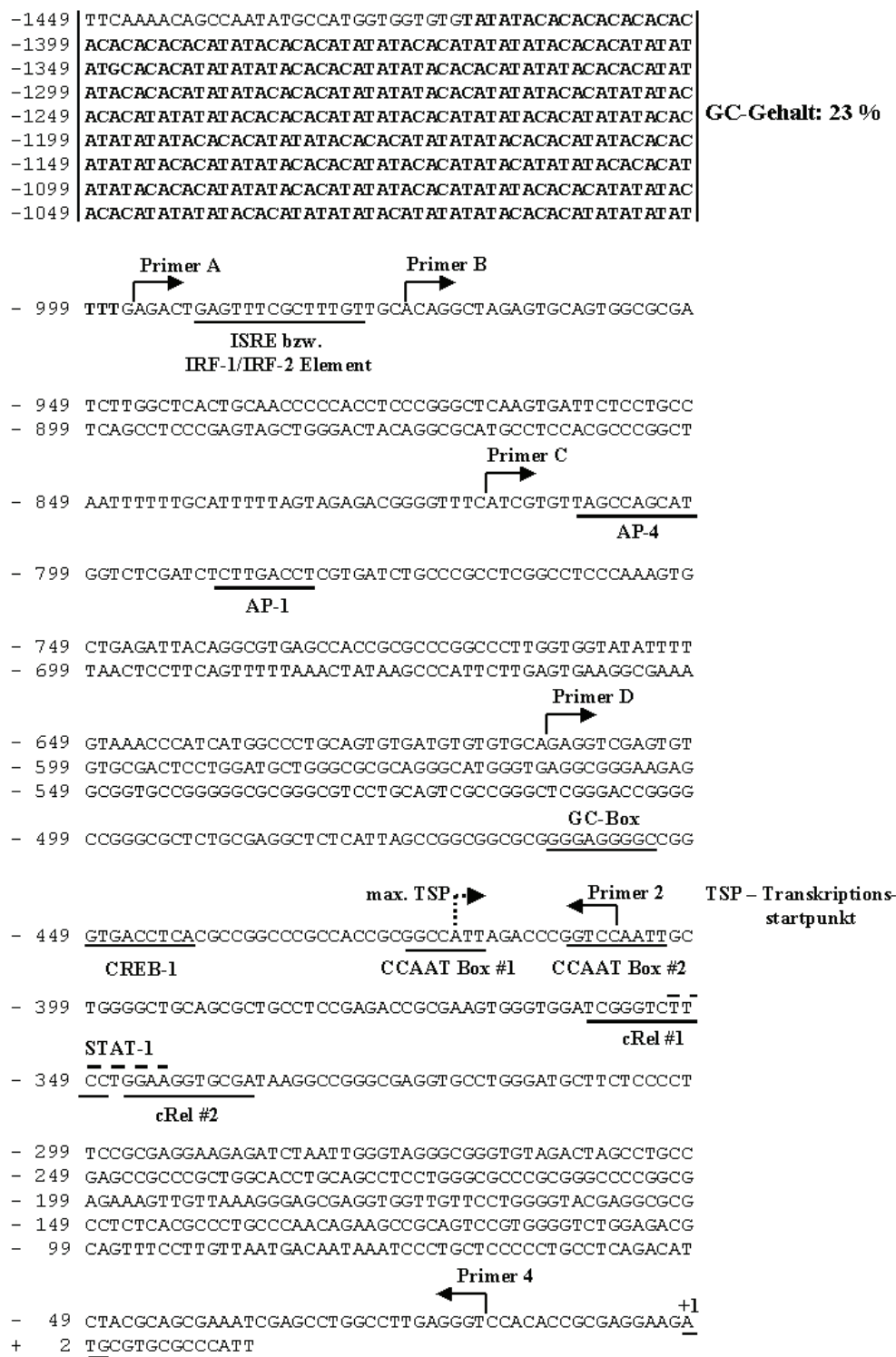


Abbildung 29: Schematische Darstellung der regulatorischen Region des H-REV107-1 Gens mit potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Der Translationsstartpunkt ist mit A⁺1TG gekennzeichnet. Oberhalb des Primers A befindet sich der nicht amplifizierbare Bereich. Die jeweiligen Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sind unterstrichen. Die Bindungsstelle für STAT-1 überlappt mit den Bindungsstellen cRel #1 und cRel #2 und ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Der gestrichelte Pfeil max. TSP zeigt den Transkriptionsstartpunkt der längsten *H-REV107-1* cDNA (DBTSS).

Tabelle 15: Zusammenfassung der mittels PCR hergestellten Promoterkonstrukte. Beginn und Ende der jeweiligen Konstrukte sind auf den Translationsstartpunkt +1 bezogen.

Name	Primer		Größe (bp)	Beginn	Ende
	5'- 3'	3'- 5'			
A-2	A	2	592	- 996	- 405
B-2	B	2	569	- 973	- 405
C-2	C	2	414	- 818	- 405
D-2	D	2	208	- 612	- 405
A-4	A	4	980	- 996	- 17

3.6.2 SEAP Reporter Assay

NIH3T3 Zellen werden mit den Konstrukten transfiziert und die Aktivität, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert (Aktivität SEAP / Aktivität Renilla) von drei oder sechs Transfektionen. Die jeweiligen Mittelwerte der Aktivität der Konstrukte wird relativ zum Mittelwert der Aktivität des Vektors SEAP-Basic angegeben. Diese Berechnung der Werte gilt für alle folgenden Reporter Assays.

Das Konstrukt A-4, das auch einen großen Teil des 5'-untranslatierten *H-REV107-1* cDNA Bereichs abdeckt, besitzt die größte Aktivität. Das Konstrukt A-2, welches den gesamten Promoterbereich bis zum längsten Transkriptionsstartpunkt enthält, hat eine relativ niedrige Aktivität. Überraschend ist, dass B-2, welches um 23 bp, die das ISRE Element enthalten, verkürzt wurde, eine deutlich stärkere Aktivität hat. Dies deutet daraufhin, dass in dem Bereich A bis B ein Element sitzt, das die Aktivität des Promoters senkt. Dabei dürfte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Element IRF-1/ISRE handeln. Das Konstrukt C-2 besitzt eine niedrige Aktivität, entsprechend der Aktivität des Konstrukts A-2. D-2 zeigt wiederum eine höhere Aktivität als C-2. Diese Aktivitätssteigerung kann auf Grund der Größe des Fragments keinem Element zugeordnet werden (Abb. 30).

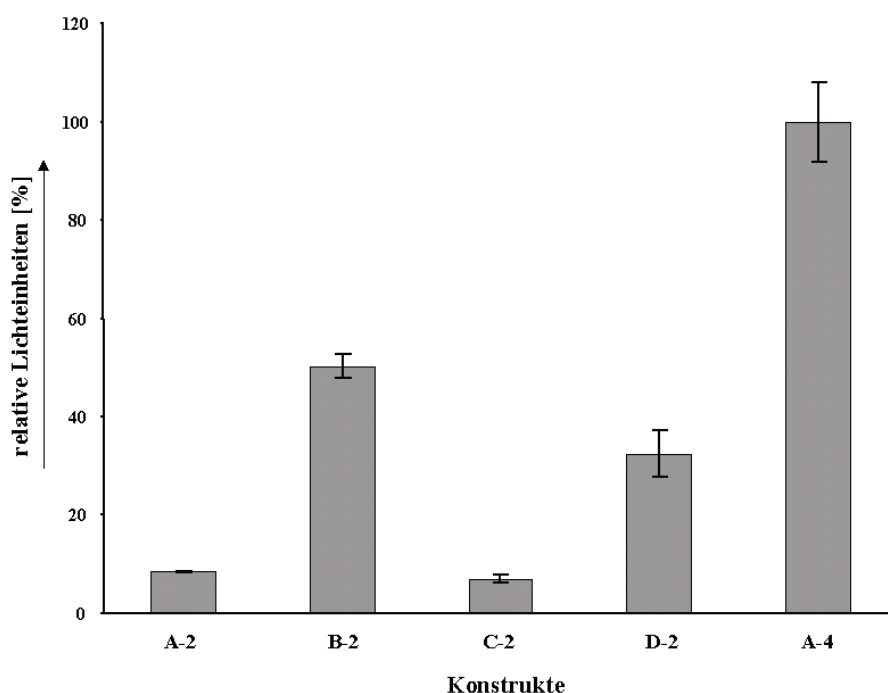


Abbildung 30: Aktivität der verschiedenen Promoter-Konstrukte im SEAP II Reporter Assay in NIH3T3 Zellen. Die Aktivitäten sind relativ zum Wert der Aktivität des Leervektors SEAP-Basic angegeben.

Tabelle 16: Zahlenwerte zur Abbildung 30. In der Zelllinie NIH3T3 wurde der Mittelwert der Luciferase-Aktivität der einzelnen Konstrukte relativ zum Mittelwert der Luciferase Aktivität des Leervektors SEAP-Basic gemessen. Jede Transfektion wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Mittelung der Werte, die Fehlerfortpflanzung wurde beim Errechnen der relativen Werte berücksichtigt. Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-4 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-2	8	0
B-2	50	2
C-2	7	1
D-2	32	5
A-4	100	8

In weiteren Versuchen zeigt sich, dass der SEAP2 Reporter Assay nicht zuverlässig arbeitet. Bei Ko-Transfektionen von Promoter-Konstrukten mit Expressionsplasmiden bzw. deren Leervektoren ergeben sich Aktivitäten, die diesen Assay in Frage stellen.

Als Beispiel ist die Ko-Transfektion des Konstrukts A-4 mit dem Expressionsplasmid pDCR-RAS gezeigt. Während die Aktivität des Konstrukts A-4 bei Ko-Transfektion mit dem pDCR-RAS Plasmid gleich bleibt, führt die Ko-Transfektion des Leervektors pDCR zu einer deutlich gesteigerten Aktivität (Abb. 31). Die Ko-Transfektion des Leervektors sollte aber keinen Einfluss auf die Aktivität des Konstrukts A-3 besitzen.

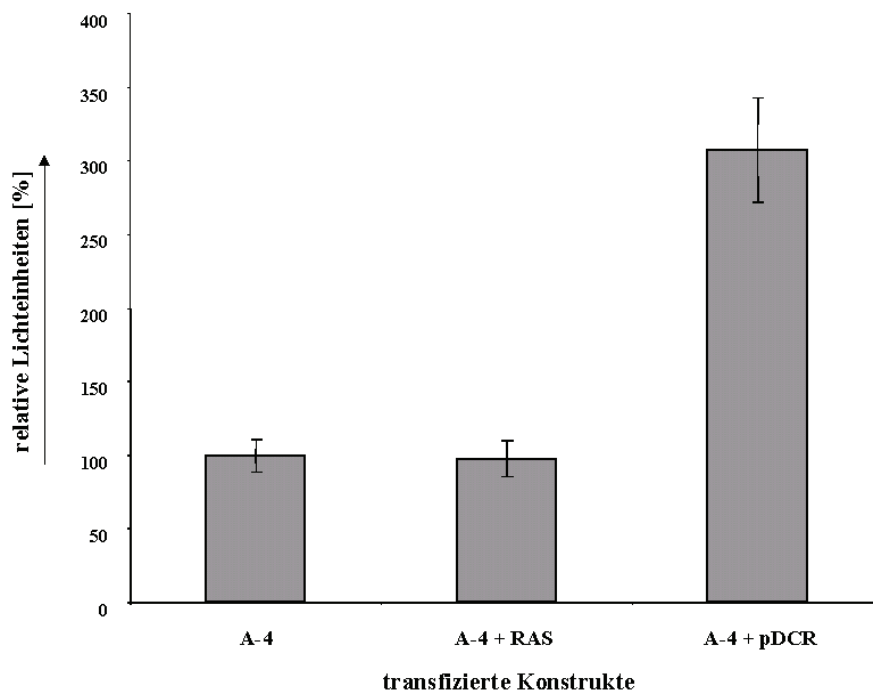


Abbildung 31: Aktivität des SEAP II Promoterkonstrukts A-4, nach Ko-Transfektion eines RAS Expressionsplasmids (A-4 + RAS) bzw. des entsprechenden Leervektors pDCR (A-4 + pDCR) in NIH3T3 Zellen.

Auf Grund dieser störenden Wechselwirkungen zwischen den SEAP Konstrukten und ko-transfizierten Expressionsplasmiden, die keine zuverlässigen Aussagen aus den Experimenten mehr zulassen, wird ein zuverlässigerer Reporter Assay ausgesucht. Dazu werden die Fragmente in das Reportervektor-System pGL3 von Promega kloniert.

3.7 Analyse des *H-REV107-1* Promoters im Dualen Luciferase Reporter System pGL3

3.7.1 Klonierung des *H-REV107-1* Promoters in den Dualen Luciferase Vektor pGL3

Der Vorteil des pGL3 Vektorsystems von Promega ist die Entfernung eventuell vorhandener Transkriptionsfaktorbindungsstellen aus der Sequenz des pGL3 Vektors. Jede Sequenz enthält potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die im pGL3 Vektor durch gezielten Austausch einzelner Basen weitestgehend eliminiert wurden.

Das pGL3-System basiert auf der Messung zweier unterschiedlicher Luciferase Aktivitäten, der Luciferasen aus Renilla (*Renilla reniformis*) und Firefly (*Photinus pyralis*). Dabei steuert der zu untersuchende Promoter die Expression des Firefly Luciferase Gens, während das Renilla Luciferase Gen vom konstitutiv aktiven Promoter der Thymidin Kinase des Herpes Simplex Virus gesteuert wird. Die Proteine der Firefly Luciferase und der, als interne Transfektionskontrolle dienenden Renilla Luciferase, befinden sich gemeinsam im Zellextrakt. Dieser Zellextrakt wird in einem Röhrchen in das Luminometer eingebracht. Jetzt wird zuerst die Substanz Beetle Luciferin eingespritzt und so die Aktivität der Firefly Luciferase messbar gemacht. Nach einer festgelegten Zeit wird diese Leuchtreaktion durch Einspritzen des „Stop & Glo“-Substrats unterdrückt und gleichzeitig die Aktivität der Renilla Luciferase durch das hierin enthaltende Coelenterazine angeregt. So werden beide Aktivitäten in einem Ansatz, zeitlich von einander getrennt, gemessen.

Da im pGL3-Basic Vektor zwar ebenfalls die Kpn1-, jedoch nicht die EcoR1-Schnittstelle vorhanden ist, müssen mit Hilfe der PCR neue Fragmente mit geänderten Schnittstellen (Kpn1, Sma1) amplifiziert und in den Vektor pGL3-Basic kloniert werden. Dazu werden der Primer A und der Primer 3 um die Sequenz der Restriktionselemente (Kpn1, Sma1) verlängert. Mit diesen Primern wird mittels PCR aus dem Konstrukt SEAP A-4 ein DNA-Fragment amplifiziert. Die an den Enden eingebauten Schnittstellen werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den pGL3-Basic Vektor (Promega) ligiert. Das klonierte Fragment ist 692 bp groß und reicht bis in den 5'-untranslatierten Teil der *H-REV107-1* cDNA hinein (Abb. 33). Im Vergleich zum Primer 4, der im SEAP System verwendet wird, liegt der Primer 3, der für das pGL3 System benutzt wird, 288 bp weiter zum 5'-Ende der cDNA hin verschoben. Das hieraus resultierende Konstrukt enthält immer noch die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen cRel#1, cRel #2 und STAT-1, die potentiellen Elemente des Core-Promoters sowie den maximalen Transkriptionsstartpunkt aus der Datenbank DBTSS und den Transkriptionsstartpunkt des längsten, zur Verfügung stehenden, *H-REV107-1* cDNA Klons 12-1. Damit sollte keine, für die Aktivität des Promoters relevante, Sequenz verloren gehen. Gleichzeitig wird das Risiko artifizieller Ergebnisse verringert, da zusätzliche DNA, zwischen dem Promoter und dem Startcodon der jeweiligen Luciferase, die Aktivität des Konstrukts beeinflussen könnte. In einem ersten Test wird geprüft, ob in verschiedenen Zelllinien die Aktivität des Konstrukts mit den unterschiedlichen *H-REV107-1* Genexpressionsniveaus dieser Zelllinien übereinstimmt (Abb. 32). In den humanen Zelllinien SKOV-3 und PA-1 zeigt das Promoter-Konstrukt die höchste Aktivität. In der Maus Zelllinie NIH3T3 zeigt das Konstrukt eine mittlere Aktivität, während es in den humanen Ovarialkarzinomzelllinien A27/80 und OVCAR-3, entsprechend dem endogenen *H-REV107-1* Expressions-Niveau nur eine geringe Aktivität zeigt.

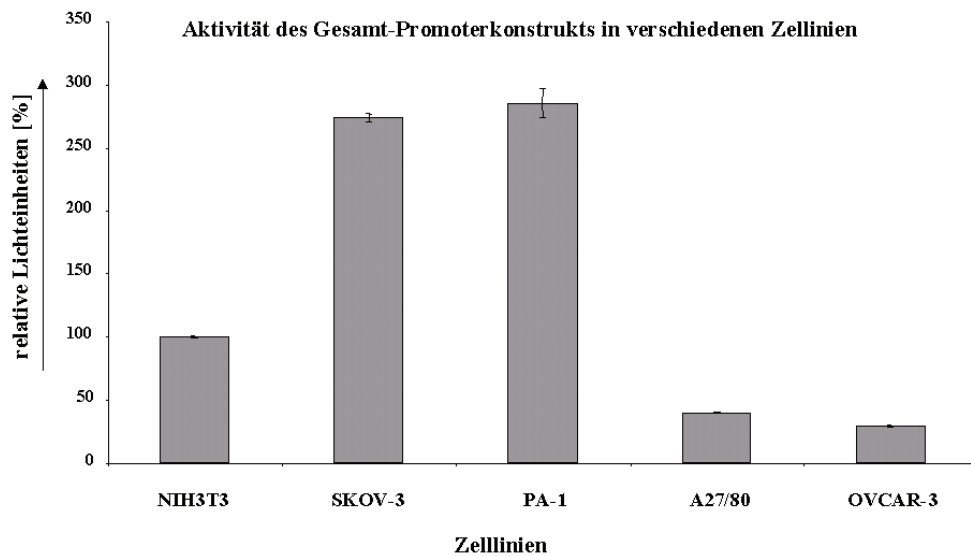


Abbildung 32: Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts (A-3) in verschiedenen Zelllinien im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega). Die Aktivitäten sind relativ zur Aktivität des Leervektors pGL3-Basic angegeben.

Tabelle 17: Zahlenwerte zur Abbildung 32. In den Zelllinien NIH3T3, SKOV-3, PA-1, A27/80 und OVCAR-3 wurde der Mittelwert der Luciferase-Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 relativ zum Mittelwert der Luciferase Aktivität des Leervektors pGL3-Basic gemessen. Jede Transfektion wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Mittelung der Werte, die Fehlerfortpflanzung wurde beim Errechnen der relativen Werte berücksichtigt. Diese Vorgehensweise gilt für alle pGL3 Promoter Assays und wird bei den folgenden Darstellungen nicht mehr beschrieben. Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 in der Zelllinie NIH3T3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte des Konstrukts A-3 in den weiteren Zelllinien beziehen sich auf diese 100%.

Zelllinien	Aktivität A-3 (%)	Standardabw. (%)
NIH3T3	100	1
SKOV-3	274	3
PA-1	286	12
A27/80	40	1
OVCAR-3	29	1

Die Aktivität des Konstrukts A-3 entspricht in etwa der Situation in den verschiedenen Zelllinien. Die Größe des Konstrukts A-3 reicht offenbar aus, um zelltypische Aktivitäten des *H-REV107-1* Promoters aufzuzeigen.

3.7.2 Die Aktivität verkürzter *H-REV107-1* Promoterkonstrukte

Zur weiteren Analyse des *H-REV107-1* Promoters werden die folgenden Konstrukte mit Hilfe der PCR hergestellt. Die Sequenzen werden jeweils mittels Sequenzierung bestätigt.

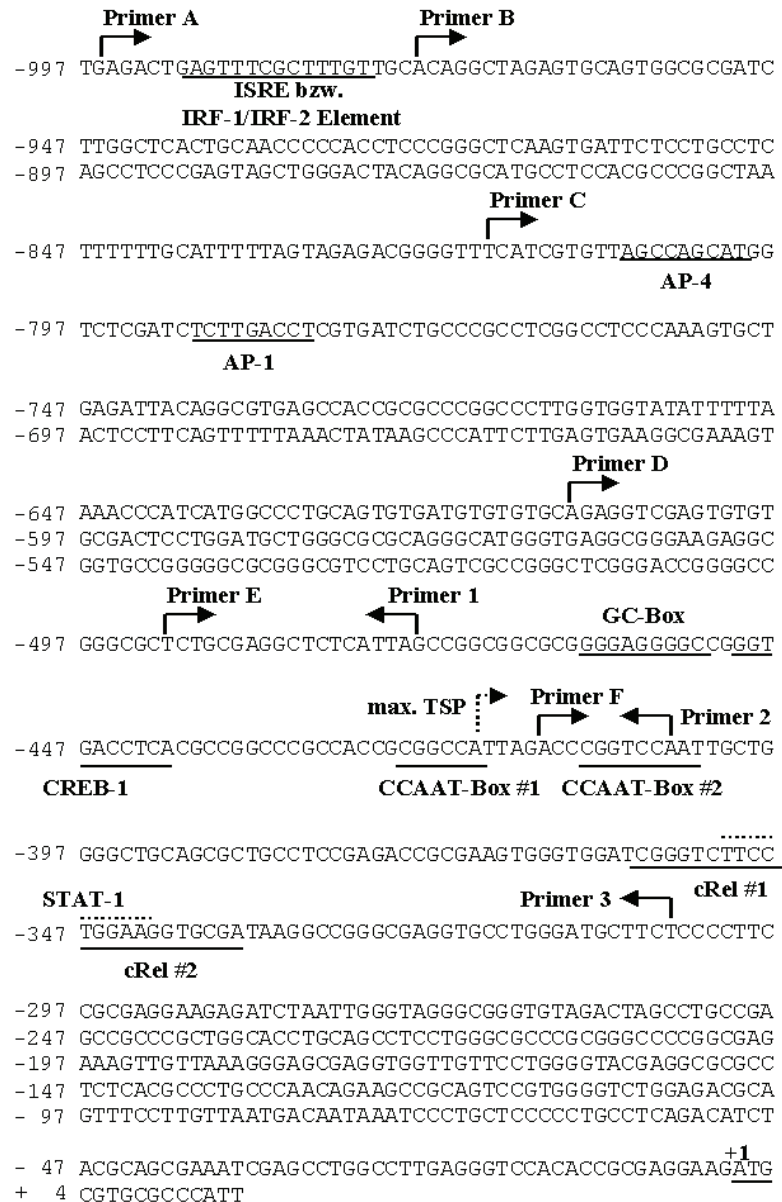


Abbildung 33: Schematische Darstellung der regulatorischen Region des *H-REV107-1* Gens mit potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Primer Positionen. Die zur Herstellung der Konstrukte verwendeten Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In 5'→3'-Richtung sind das die Primer A bis F, in 3'→5'-Richtung die Primer 1 bis 3. Die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sind unterstrichen. Die STAT-1 Bindungsstelle überlagert sich mit den Bindungsstellen cRel #1 und cRel #2 und ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Der gestrichelte Pfeil TSP zeigt den Transkriptionsstartpunkt der längsten *H-REV107-1* cDNA an. Dieser wurde aus der DBTSS Datenbank ermittelt. +1 zeigt den Translationsstartpunkt ATG an.

Neben dem Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 werden fünf vom 5'-Ende und zwei vom 3'-Ende her verkürzte Konstrukte hergestellt. Ausgehend vom Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 werden die weiteren Konstrukte vom 5'-Ende her so verkürzt, dass zuvor *in silico* identifizierte, potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungselemente abgeschnitten werden. So wird z.B. beim Übergang von Konstrukt A-3 zum Konstrukt B-3 durch Verkürzen der Sequenz um 23 Basen die Transkriptionsfaktorbindungsstelle ISRE entfernt.

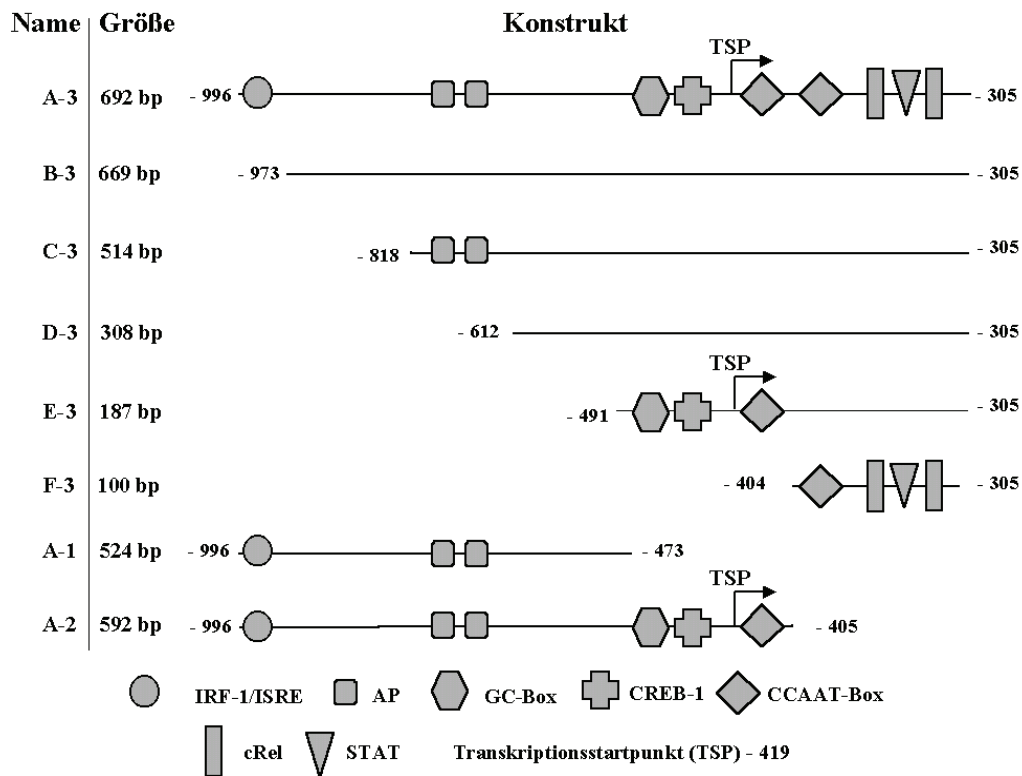


Abbildung 34: Schematische Darstellung der im pGL3 System hergestellten Promoter-Konstrukte. A-3 zeigt den Gesamtpromoter mit den potentiell funktionellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Auf den weiteren Konstrukten sind nur Bindungsstellen eingezeichnet, die nicht mehr auf dem nächstkürzeren Konstrukt vorhanden sind. Die Zahlen vor und nach dem jeweiligen Konstrukt zeigen die Entfernung zum Translationsstartpunkt +1 an.

Die Aktivität der verschiedenen Konstrukte wird zunächst in NIH3T3 im Dualen Luciferase Assay gemessen. Die Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 wird immer auf 100 % gesetzt. Wie Abbildung 35 zeigt, ergibt der Einsatz der Promoterkonstrukte zwei deutliche Ergebnisse. Zum Ersten einen Anstieg der Aktivität nach Deletion des äußersten 5'-Endes des Promoters beim Übergang vom Konstrukt A-3 zu B-3 um ca. 25 %. Beim Übergang von Konstrukt B-3 zu Konstrukt C-3 erhöht sich die Aktivität um weitere 10 %. Danach sinkt die Aktivität mit zunehmender Verkürzung der Konstrukte. Die Verkürzung des Fragmentes zum Konstrukt D-3 senkt die Aktivität um 37%. Der nächste Deletionsschritt (Konstrukt E-3) senkt die Aktivität um 17%.

Das zweite, bedeutende Ergebnis ist, dass das kleinste Konstrukt F-3, dessen Startpunkt bereits hinter dem Transkriptionsstartpunkt liegt, keine Promoteraktivität mehr zeigt. Die Aktivität sinkt um 99%. In dem beim Übergang von E-3 zu F-3 entfernten Bereich sollte ein essentieller Teil des Core Promoters liegen.

Bei den Konstrukten A-2 und A-1 wurde der Promoter nicht vom 5'-Ende sondern vom 3'-Ende her verkürzt. Hier liegt der Endpunkt des Inserts nicht bei Basenpaar -305 sondern bei Basenpaar -405. Die Aktivität des Promoterkonstrukts A-2 entspricht der Aktivität des größten verwendeten Konstrukts A-3. Das Konstrukt A-1 zeigt eine Promoteraktivität die 45% niedriger liegt als die Aktivität von A-3 bzw. A-2.

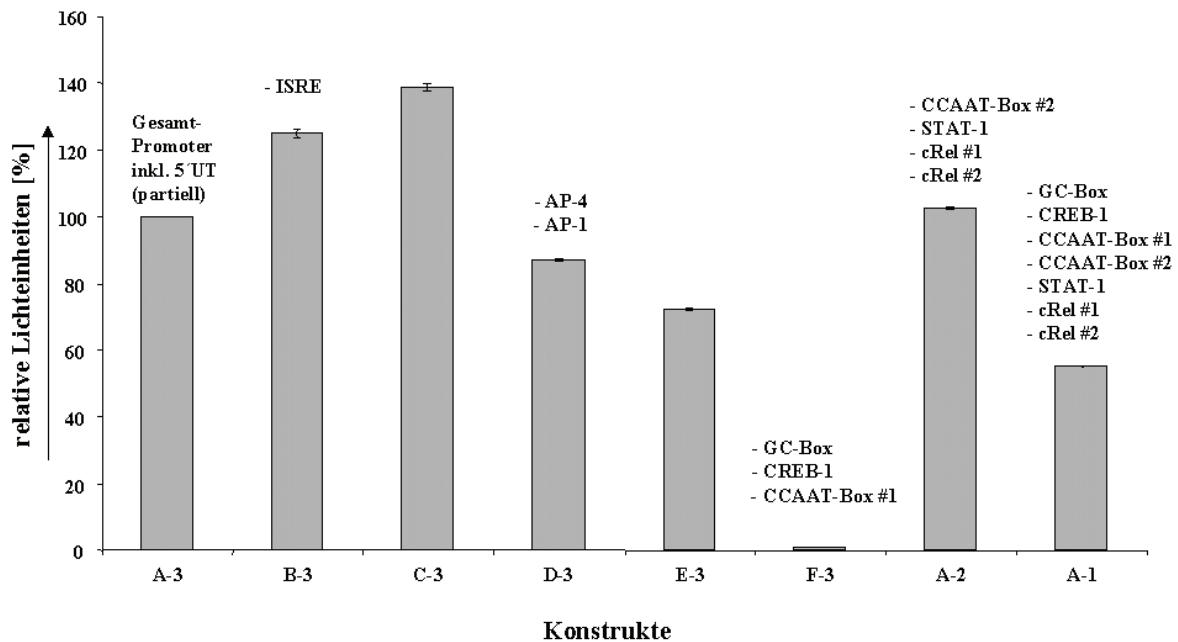


Abbildung 35: Aktivität der verschiedenen Promoterkonstrukte in der Zelllinie NIH3T3 im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega). Oberhalb der Balken sind die im Vergleich zum vorherigen Balken entfernten Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufgeführt. Die Aktivitäten sind relativ zum Wert der Aktivität des Leervektors pGL3-Basic angegeben.

Tabelle 18 Zahlenwerte zum Reporter Assay in NIH3T3 Zellen (Abb. 35). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	0
B-3	125	1
C-3	139	1
D-3	87	0
E-3	72	0
F-3	1	0
A-2	102	0
A-1	55	0

Die Transfektion der Zelllinie SKOV-3 führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei der Zelllinie NIH3T3 (Abb. 36). Auch hier erfolgt eine Zunahme der Aktivität beim Übergang vom Konstrukt A-3 zum Konstrukt B-3 und das Konstrukt F-3 zeigt keine Promoteraktivität mehr. Im Unterschied zu NIH3T3 liegt aber hier die Aktivität von D-3 um 40% über der Aktivität von A-3. E-3 zeigt dafür eine deutlich geringere Aktivität von nur 33% der Aktivität von A-3. Auch die Konstrukte A-2 und A-1 besitzen in SKOV-3 eine deutlich niedrigere Promoteraktivität als in NIH3T3, nur 22% (A-2) und 8% (A-1).

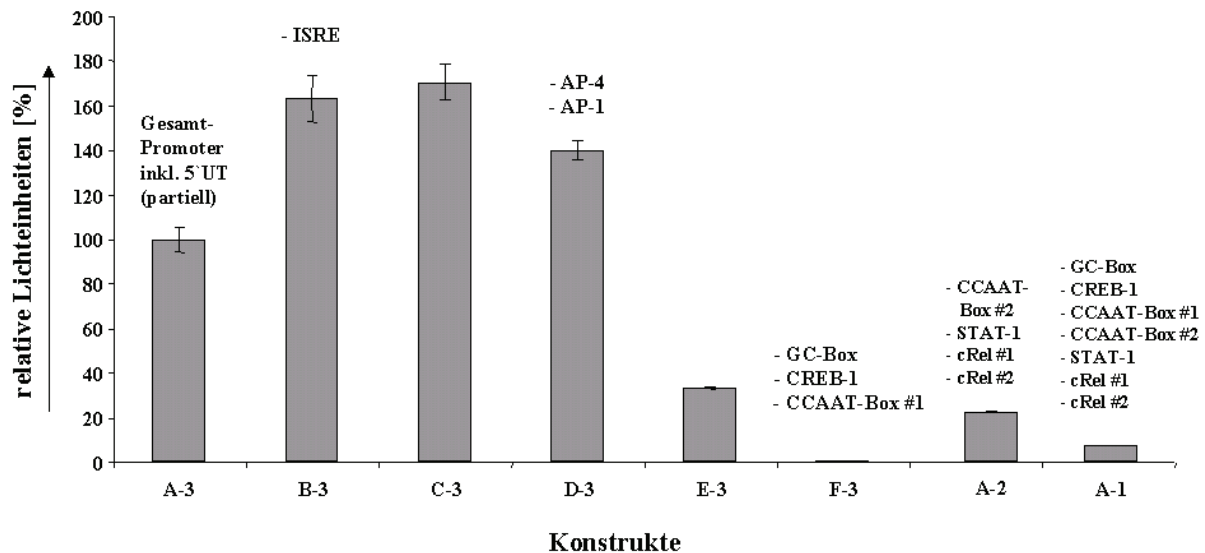


Abbildung 36: Aktivität der verschiedenen Promoterkonstrukte in der Zelllinie SKOV-3 im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega). Oberhalb der Balken sind die im Vergleich zum vorherigen Balken entfernten Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufgeführt. Die Aktivitäten sind relativ zum Wert der Aktivität des Leervektors pGL3-Basic angegeben.

Tabelle 19: Zahlenwerte zum Reporter Assay in SKOV-3 Zellen (Abb. 36). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	6
B-3	163	10
C-3	171	8
D-3	140	4
E-3	33	0
F-3	0	0
A-2	22	0
A-1	8	0

Dagegen verhalten sich in der Zelllinie A27/80 die Konstrukte etwas anders (Abb. 37). Auffallend ist vor allem die Abnahme der Promoteraktivität beim Übergang von A-3 nach B-3. Auch die Aktivität der folgenden Konstrukte C-3 bis E-3 liegen alle unterhalb der Aktivität von A-3. Besonders D-3 zeigt im Vergleich zu den Zelllinien SKOV-3 und NIH3T3 eine sehr geringe Aktivität von nur 45% der Aktivität von A-3. F-3 besitzt wiederum keine Promoteraktivität mehr mit nur 7% der Aktivität von A-3. A-2 verhält sich, entsprechend dem Experiment in der Zelllinie SKOV-3, mit einer Rest-Aktivität von 19%.

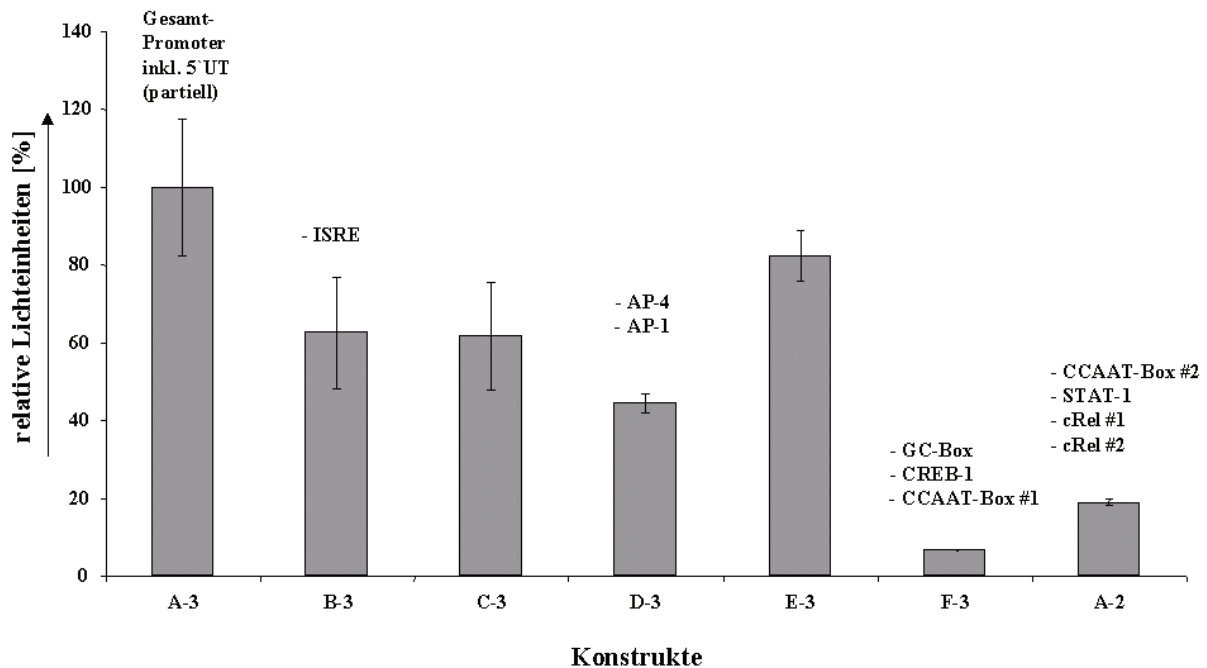


Abbildung 37: Aktivität der verschiedenen Promoterkonstrukte in der Zelllinie A27/80 im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega). Oberhalb der Balken sind die im Vergleich zum vorherigen Balken entfernten Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufgeführt. Die Aktivitäten sind relativ zum Wert der Aktivität des Leervektors pGL3-Basic angegeben.

Tabelle 20 Zahlenwerte zum Reporter Assay in A27/80 Zellen (Abb. 37). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	18
B-3	63	14
C-3	62	14
D-3	45	2
E-3	82	6
F-3	7	0
A-2	19	1

Um die Bedeutung der ISRE/IRF-1-Bindungsstelle genauer zu untersuchen, wurden in verschiedenen Zelllinien die Aktivitäten der Konstrukte A-3 und B-3 wiederholt verglichen. Die Aussagen dieser Experimente ergaben jedoch keinen reproduzierbaren, signifikanten Unterschieden zwischen A-3 und B-3 (Abb. 38).

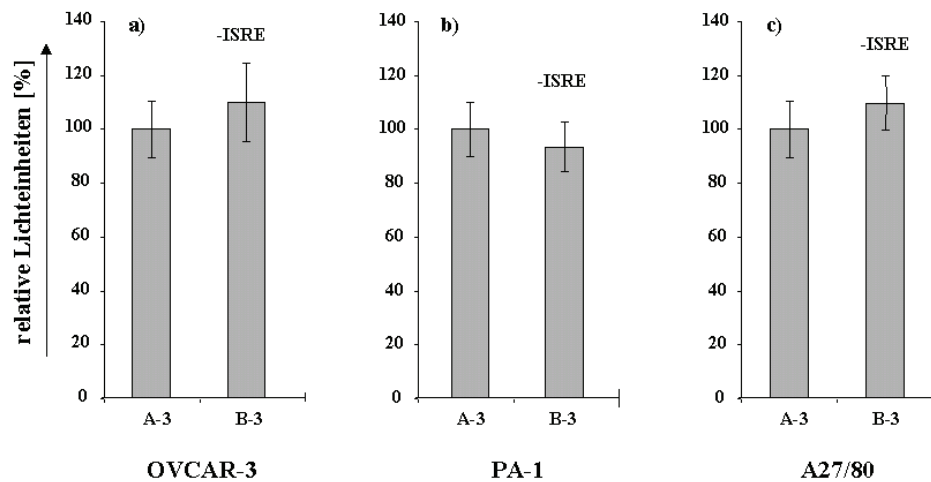


Abbildung 38: Aktivität der Promoterkonstrukte A-3 und B-3 in der Zelllinie OVCAR-3, PA-1 und A27/80 im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega). Oberhalb der Balken ist die im Vergleich zum vorherigen Balken entfernte Transkriptionsfaktorbindungsstelle IRF-1/ISRE aufgeführt.

Tabelle 21: Zahlenwerte zum Reporter Assay in OVCAR-3, PA-1 und A27/80 Zellen (Abb. 38). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde jeweils gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	A-3		B-3	
	Aktivität (%)	Standardabw. (%)	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
a) OVCAR-3	100	10	110	14
b) PA-1	100	10	94	9
c) A27/80	100	11	110	10
d) A27/80	100	14	72	7

Insgesamt scheint die Methode der transienten Transfektion nicht ausreichend zu sein, um die Rolle der ISRE-Bindungsstelle für die Aktivität des Promoters zu bestimmen.

Trotzdem zeigen die Experimente erste Ergebnisse, die Rückschlüsse auf wichtige, regulatorische Elemente des *H-REV107-1* Promoters zulassen. So führt der Übergang von E-3 zu F-3 zum vollständigen Verlust der Promoteraktivität. In diesem Bereich liegen die Elemente der basalen Promoter Aktivität. Dieses Ergebnis zeigen die hier untersuchten Zelllinien NIH3T3, SKOV-3 und A27/80. In den folgenden Experimenten soll der Einfluss verschiedener Signalwege auf die Aktivität des Promoterkonstrukts untersucht werden.

3.7.3 Die Aktivität der *H-REV107-1* Promoterkonstrukte nach Stimulation mit IFN- γ , TNF- α , cAMP und Nogalamycin

Die weiteren Experimente zur Untersuchung des *H-REV107-1* Promoters werden hauptsächlich in der Zelllinie NIH3T3 durchgeführt, da der Promoter in einem Umfelds analysiert werden soll, der einer normalen Zelle am ehesten entspricht. NIH3T3 ist hier, neben HOSE, die einzige nicht maligne Zelllinie. NIH3T3 lässt sich aber, im Gegensatz zu HOSE, sehr gut transfizieren. Die Tumorzelllinien A27/80, OVCAR-3, SKOV-3 und PA-1 besitzen alle deregulierte Signalwege. *H-REV107-1* wird in der Zelllinie SKOV-3 exprimiert und scheint hier keine Funktion als Wachstums-Suppressor auszuüben. In den Zelllinien OVCAR-3 und A27/80 ist die Promoteraktivität sehr schwach. Dies kann zu Problemen bei der Interpretation von Daten führen, wenn die Aktivitätsänderungen auf Grund der geringen Gesamtaktivitäten nicht deutlich sichtbar werden.

Die Zelllinie NIH3T3 wird nach Transfektion mit dem Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 mit verschiedenen Reagenzien behandelt, die zur Induktion definierter Signalwege führen. IFN- γ aktiviert den STAT-Signalweg, TNF- α den NF κ B-Signalweg und cAMP den Transkriptionsfaktor CREB. Nogalamycin stimuliert die Phosphorylierung des GC-Box-bindenden Transkriptionsfaktors SP-1 und steigert die Bindung von SP-1 an die DNA. (Rafty L. A., Nucleic Acids Research, 2001, 29, 5).

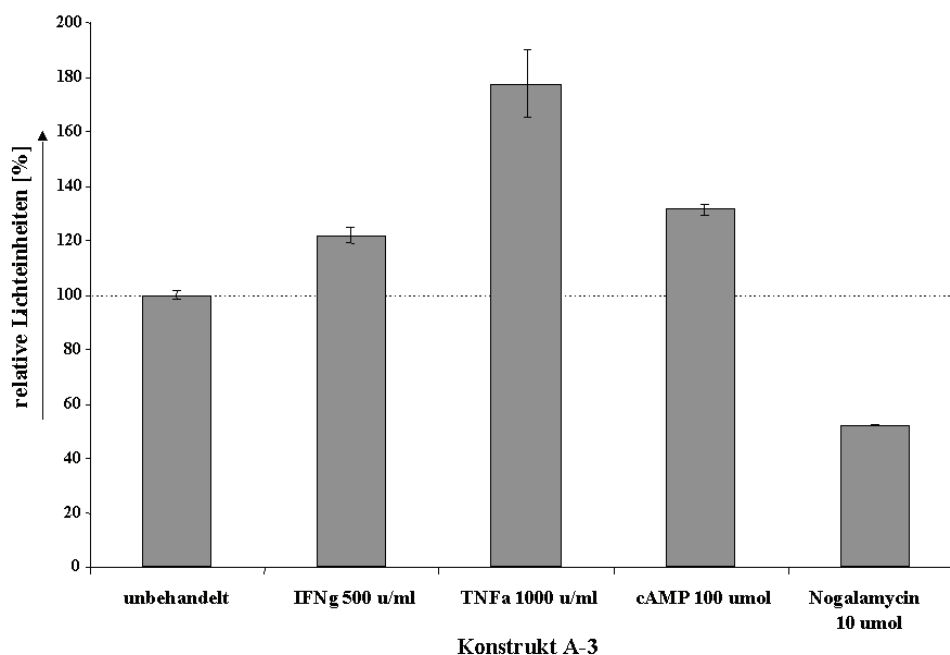


Abbildung 39: Induktion von NIH3T3 Zellen mit verschiedenen Reagenzien und Messung der Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3. Die Behandlung erfolgt für 24 Stunden und beginnt 4 Stunden nach der Transfektion der Zellen mit dem Promoterkonstrukt. Die Konzentrationen bezeichnen die Endkonzentrationen im Medium. Die Aktivitäten sind relativ zum Wert der Aktivität des Leervektors pGL3-Basic angegeben.

Wie Abbildung 39 zeigt, führt die Aktivierung des STAT-Signalwegs (IFN- γ) zu einer Aktivitätszunahme des Promoters von 22%. Nach Behandlung der Zellen mit TNF- α steigt die Aktivität des Konstrukts um 78%. Dieser deutliche Anstieg zeigt eine klare Abhängigkeit des *H-REV107-1* Promoters von einem durch TNF- α induzierten Signalweg. Die Behandlung der Zellen mit cAMP und die damit verbundene Aktivierung des CREB-Signalwegs führt zu einer Steigerung der Aktivität um 32%. Nogalamycin hingegen vermindert die Aktivität des Promoterkonstrukts um 52%.

Tabelle 22 Zahlenwerte zum Reporter Assay in NIH3T3 Zellen (Abb. 39). Der Wert für das unbehandelte Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Messungen beziehen sich auf diese 100%.

	unbehandelt	IFN- γ 500 U/ml	TNF- α 1000 U/ml	cAMP 100 μ mol	Nogalamycin 10 μ mol
Aktivität (%)	100	122	178	132	52
Standardabw. (%)	2	3	12	2	0

Nur die Induktion des Promoterkonstrukts A-3 mit TNF- α führt zu einer deutlich gesteigerten Promoteraktivität. Durch die Induktion der Deletionskonstrukte soll jetzt untersucht werden, ob die induzierte Aktivitätssteigerung einem bestimmten Sequenzabschnitt zugeordnet werden kann. Dazu werden die Deletionskonstrukte A-3 bis F-3 in NIH3T3 Zellen transfiziert und mit 1000U/ml TNF- α behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Induktion der Zelllinie mit TNF- α führt zu einer höheren Aktivität der Promoterkonstrukte A-3 bis D-3. Erst beim Konstrukt E-3 existiert trotz Behandlung mit TNF- α keine gesteigerte Promoteraktivität mehr. Ob dies bedeutet, dass in dem Bereich zwischen D-3 und E-3 eine, für die Steigerung der Aktivität durch TNF- α verantwortliche, Bindungsstelle liegt, kann daraus nicht abgeleitet werden.

Da die Aktivität des Konstrukts E-3, sowohl im TNF- α induzierten als auch im unbehandelten Zustand, nur noch bei 14% der Ausgangsaktivität liegt, besteht auch die Möglichkeit, eine möglicherweise vorhandene Induktion nicht mehr sichtbar ist. Eine Analyse des Sequenzbereiches zwischen D-3 und E-3 mit dem Programm MatInspector zeigt keine bekannte TNF- α abhängige Bindungsstelle. Auch bei der Aktivität des Konstrukts F-3, die mit 3% Restaktivität gegen Null geht, zeigt sich kein Unterschied mehr zwischen der mit TNF- α induzierten und der nicht induzierten Messung.

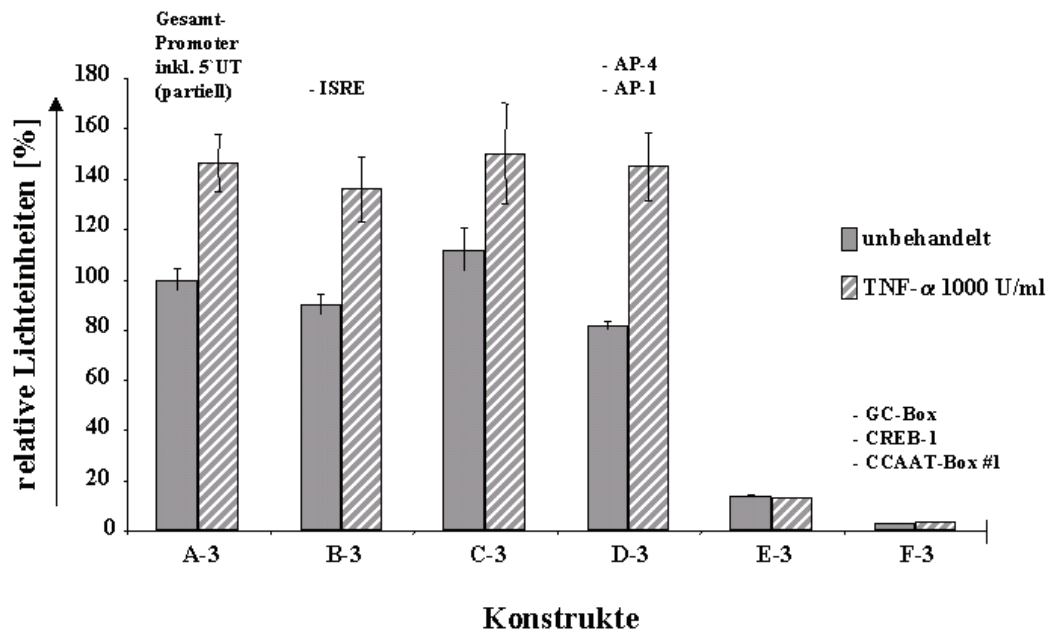


Abbildung 40: Aktivität verschiedener Promoterkonstrukte in der unbehandelten oder mit TNF- α (1000 U/ml) behandelten Zelllinie NIH3T3 im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega). Oberhalb der Balken sind die im Vergleich zum vorherigen Konstrukt entfernten Transkriptionsfaktorbindungsstellen aufgeführt. Die Aktivitäten sind relativ zum Wert der Aktivität des Leervektors pGL3-Basic angegeben.

Tabelle 23: Zahlenwerte zum Reporter Assay in NIH3T3 Zellen (Abb. 40). Der Wert für das in unbehandelte NIH3T3 Zellen transfizierte Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	unbehandelt		TNF- α 1000 U/ml	
	Aktivität (%)	Standardabw. (%)	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	4	146	11
B-3	90	4	136	13
C-3	112	9	150	20
D-3	81	2	145	13
E-3	14	0	13	0
F-3	3	0	3	0

Die Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts wird durch TNF- α induziert. Dieses Ergebnis entspricht der beobachteten Induktion der endogenen *H-REV107-1* Expression durch TNF- α in der Nierenkarzinomzelllinie MZ1257 (Abb. 19) und deutet auf eine Abhängigkeit des *H-REV107-1* Promoters vom NF κ B-Signalweg hin. Die Aktivitäten der Deletionskonstrukte lassen aber keinen direkten Rückschluss auf die Position einer involvierten Transkriptionsfaktorbindungsstelle zu. IFN γ und cAMP zeigen nur eine schwache Induktion der Promoteraktivität.

Die Experimente mit den Deletionskonstrukten zeigen Bereiche, die eine regulatorische Funktion für den Promoter besitzen. Diese Ergebnisse sollen nicht nur Sequenzbereichen, sondern definierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen zugeordnet werden. Dazu werden einzelne Bindungsstellen durch den Austausch von Basen spezifisch mutiert und die verbleibende Promoteraktivität des Konstrukts bestimmt.

3.7.4 Die Aktivität der *H-REV107-1* Promoterkonstrukte nach Mutation einzelner Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Die *in silico* Analyse der Promotersequenz mit der Software MatInspector von Genomatix (siehe Kapitel 3.6.4) führte zu einer Liste von potentiellen Transkriptionsfaktorenbindungsstellen. Diese wird mit den bisherigen Ergebnissen verglichen.

- 1) Ein essentieller Teil des Core Promoters liegt vermutlich im Sequenzbereich –491 bis –414, entsprechend dem Bereich zwischen den Primern E und F. Die Deletion dieses Bereichs führt zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Reporterkonstrukts. Der Bereich enthält die potentiellen, regulatorischen Elemente GC-Box, CREB-1 Element und CCAAT-Box#1.
- 2) Zwischen den Basen – 991 und – 973, entsprechend dem Bereich zwischen den Primern A und B, liegt ein negativ-regulatorisches Element. Hier befindet sich das Element ISRE/IRF-1.
- 3) Die Induzierbarkeit des Promoterkonstrukts A-3 durch IFN- γ , TNF- α und cAMP legt nahe, dass die Bindungsstellen für IRF-1 (Basen -989 bis –977), STAT (Basen -341 bis –353), cRel (eine Untereinheit von NF κ B, Basen –347 bis -358) und CREB (Basen –450 bis –439) für die Regulation des Promoters eine wichtige Rolle spielen.

Diese Transkriptionsfaktorbindungsstellen werden mit Hilfe des „Quik Change Site-Directed Mutagenesis“-Kits (Stratagene) verändert. Dabei werden ein oder zwei Basen so ausgetauscht, dass bei einer Wiederholung der *in silico* Analyse die zuvor gefundene Transkriptionsfaktorbindungsstelle auch mit weniger stringenten Suchkriterien nicht mehr gefunden wird. Hierbei wird sorgfältig darauf geachtet, dass durch die eingeführten Mutationen keine weiteren Bindungsstellen zerstört bzw. neue Bindungsstellen geschaffen werden. Neben den bereits erläuterten Bindungsstellen wird auch das Element CCAAT-Box #2, das sich direkt 5' von dem Element CCAAT-Box #1 und dem Transkriptionsstartpunkt DBTSS befindet, und die Elemente AP-1 und AP-4, die sich im Sequenzbereich zwischen den Primern C und D befinden, mutiert.

Nach Transfektion der mutierten Konstrukte in die Zelllinie NIH3T3 zeigt sich im Dualen Luciferase Assay, welche Transkriptionsfaktorbindungsstellen eine funktionelle Rolle in der Promoteraktivität spielen (Abb. 41).

Tabelle 24: Tabelle der in die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen eingeführten Mutationen. Im Vergleich werden die Erkennungssequenzen (ES) des Wildtyps (wt) und der mutierten Form (mt) gezeigt. Eingeführte Mutationen sind mit großen Buchstaben gekennzeichnet. Die Position gibt die Position der Bindungsstelle innerhalb des Promoters an. (Translationsstart = +1)

Transkriptionsfaktor	ES wt	ES mut	Position
IRF-1/IRF-2/ISRE	Agtttcgctttgt	ag <u>G</u> tttcgct <u>G</u> tgt	-989 — -977
AP-4 +	Agccagcat	agc <u>A</u> agcat	-808 — -800
AP-1	Tcttgacct	tctt <u>A</u> acct	-789 — -781
GC-Box	Gggaggggc	GGGAC <u>C</u> GGGC	-461 — -453
CREB-1	Ggtgacctcacg	ggtg <u>C</u> cc <u>G</u> cacg	-450 — -439
CCAAT-Box #2	Cccggtccaattgct	cccgggtc <u>T</u> aattgct	-413 — -399
CCAAT-Box #1	Cgcggccattaga	cgcggtc <u>T</u> attaga	-426 — -414
cRel #1	Tcgggtcttcct	tc <u>I</u> gggtcttc <u>A</u> t	-358 — -347
STAT	Tcttcttggaagg	tct <u>G</u> cctgg <u>C</u> agg	-353 — -341
cRel #2	Ctggaaggtgcga	ctggaaggtg <u>A</u> ga	-348 — -336

Besonders stark ist die durch Mutation der Bindungsstelle cRel #1 erzielte Aktivitätsabnahme. Hier beträgt die Restaktivität des Konstrukts cRel #1 mt nur 9% der Ausgangsaktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3. Die Mutation der, in direkter Nachbarschaft liegenden, Bindungsstelle cRel #2 (Konstrukt cRel #2 mt) führt zu einer Restaktivität von 35%, die gemeinsame Mutation der cRel Bindungsstellen (Konstrukt cRel #1 + cRel #2 mt) zeigt eine Restaktivität von 7%. Dies zeigt, dass die erste cRel Bindungsstelle eine höhere Funktionalität für den *H-REV107-1* Promoter besitzt als die zweite cRel Bindungsstelle, und dass diese Bindungsstelle essentiell für die Aktivität des Promoters ist.

Von ebenfalls wesentlicher Bedeutung für die Aktivität des Promoters ist die Bindungsstelle CREB. Die Mutation dieses Sequenzmotivs (Konstrukt CREB-1 mt) führt ebenfalls zu einer starken Abnahme der Promoterleistung, hier ergibt sich eine Restaktivität von nur 37%.

Die Mutation in der Bindungsstelle CCAAT-Box #1 (Konstrukt CCAAT #1 mt) zeigt keine signifikante Abnahme der Aktivität, die Mutation der Bindungsstelle CCAAT-Box #2 (Konstrukt CCAAT #2 mt) überhaupt keine Abnahme der Aktivität. Die gemeinsame Mutation der beiden CCAAT-Bindungsboxen (Konstrukt CCAAT #1 mt + CCAAT #2 mt) führt zu einer Abnahme der Promoteraktivität um 50%. Dies erreicht auch die Mutation

der GC-Box (Konstrukt GC-Box mt). Die gemeinsame Mutation der AP-1 und der AP-4 Bindungsstelle (Konstrukt AP-1 mt + AP-4 mt) führt zu einer Restaktivität des Promoters von 60%.

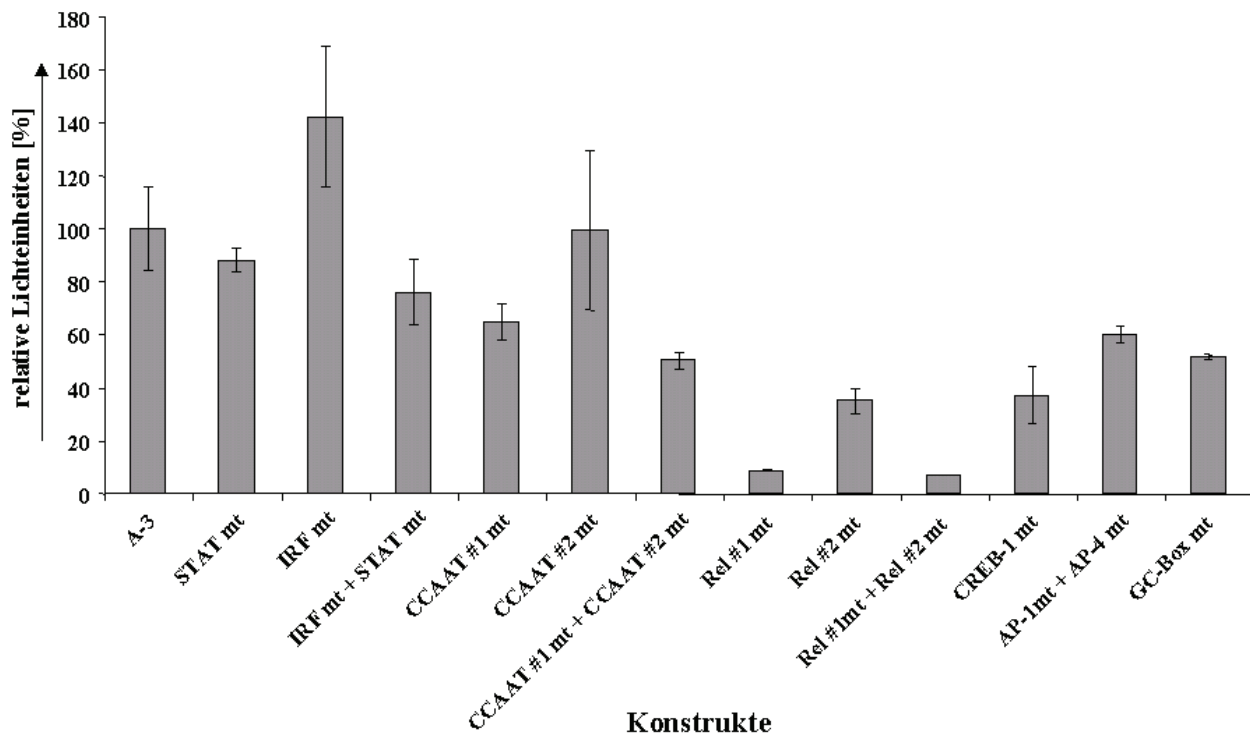


Abbildung 41: Aktivität mutierter Promoterkonstrukte sowie des methylierten Gesamtpromoter-Konstrukts (A-3 methyliert) in der Zelllinie NIH3T3

Tabelle 25: Zahlenwerte zum Reporter Assay in NIH3T3 Zellen (Abb. 41). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	16
STAT mt	88	5
IRF mt	142	26
IRF mt + STAT mt	76	12
CCAAT #1 mt	65	7
CCAAT #2 mt	99	30
CCAAT #1 mt + CCAAT #2 mt	50	3
cRel #1 mt	9	0
cRel #2 mt	35	5
cRel #1 + cRel #2 mt	7	0
CREB-1 mt	37	11
AP-1 mt + AP-4 mt	60	3
GC-Box mt	52	1

Die Mutation von STAT (Konstrukt STAT mt) führt zu keiner signifikanten Abnahme der Promoteraktivität. Auch die Mutation von IRF-1 (Konstrukt IRF mt) senkt die Aktivität des Promoters nicht, im Gegenteil die Aktivität nimmt um etwa 40% zu. Dies ist bemerkenswert, da die Transkriptionsfaktorbindungsstelle für IRF-1 auf dem 5'-Ende des Promoters liegt. Dies entspricht genau dem Abschnitt, der bei der Deletion von A-3 nach B-3 verloren geht.

Auch im Deletionsassay konnte in der Zelllinie NIH3T3 eine Zunahme der Promoteraktivität um 25% festgestellt werden. Obwohl eine klare Induktion der endogenen *H-REV107-1* Expression durch IFN- γ und IRF-1 festgestellt werden kann, lässt sich *in vitro* im transienten Assay und in Abwesenheit von IFN- γ keine direkte, stimulierende Rolle des Elements IRF-1/IRSE nachweisen.

Die Promoteraktivitäten des Konstrukts A-3 mit einigen mutierten Bindungsstellen werden auch in den Zelllinien SKOV-3 und OVCAR-3 untersucht. Hier zeigt sich ein Aktivitätsverlust nach cRel Mutation, der den in NIH3T3 Zellen beobachteten Ergebnissen entspricht. Die Mutation der IRF-Bindungsstelle hat hier keinen Einfluss.

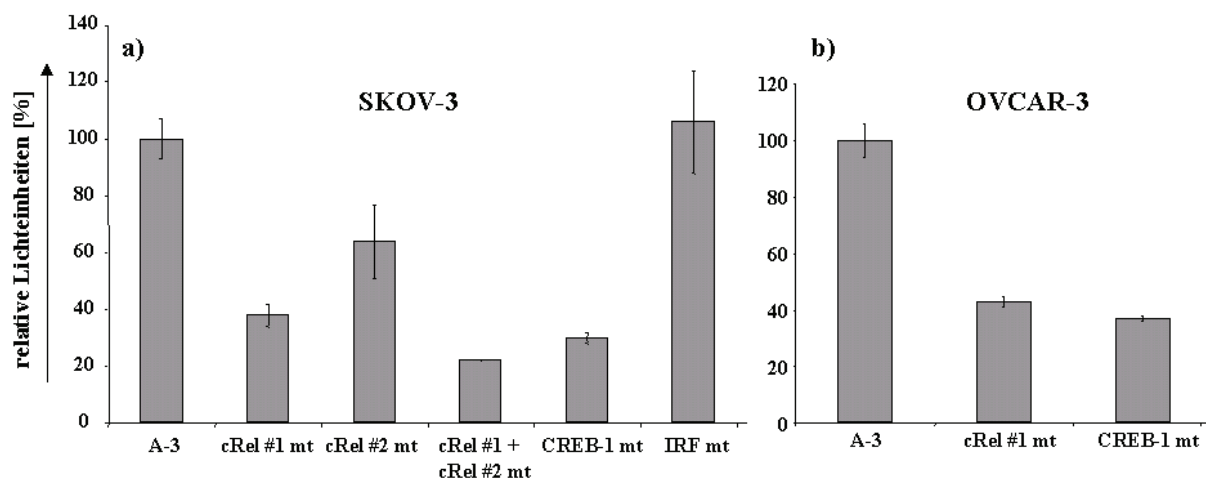


Abbildung 42: Aktivität der mutierten Promoterkonstrukte in den Zelllinien a)SKOV-3 und b) OVCAR-3 im Dualen Luciferase Reporter Assay (Promega).

Tabelle 26: Zahlenwerte zum Reporter Assay in SKOV-3 3 und OVCAR-3 Zellen (Abb. 42). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde jeweils gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	SKOV-3		OVCAR-3	
	Aktivität (%)	Standardabw. (%)	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	7	100	6
cRel #1 mt	38	4	43	2
cRel #2 mt	64	13	-	-
cRel #1 + cRel #2 mt	22	0	-	-
CREB-1 mt	30	2	37	1
IRF mt	106	18	-	-

3.7.5 Die Aktivität der *H-REV107-1* Promoterkonstrukte in Abhängigkeit vom NFκB-Signalweg

Die Mutation einer oder beider cRel Bindungsstellen führt zu einer starken Abnahme der Promoteraktivität. cRel ist eine von mehreren möglichen Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NFκB, dessen Aktivität durch vielfältige Bedingungen induziert wird und der in zahlreichen, sowohl apoptotischen als auch anti-apoptotischen, Signalwegen eine Rolle spielt. Als Beispiel wird der Signalweg, der über den TNF-Rezeptor zur Aktivierung von NFκB führt, gezeigt (Abb. 43). TNF-α bindet an den TNF-Rezeptor-1. An den Rezeptor assoziierte Proteine leiten das Signal bis zu TRAF2. Dieses aktiviert die Kinase NIK, welche wiederum den Kinase Komplex IKK aktiviert. IKK setzt sich aus IKKα, IKKβ und IKKγ zusammen. IKK phosphoryliert IκB, das NFκB, durch Maskierung des NFκB-eigenen „Nuclear Localisation Signals“, als Suppressor im Zytosol bindet. Auf Grund der Phosphorylierung von IκB spaltet sich der NFκB-IκB-Komplex auf und IκB wird vom Proteasom abgebaut. Das freie NFκB wandert in den Zellkern und bindet an die entsprechenden Bindungsstellen in den Promotoren von Zielgenen.

NFκB besteht selbst aus zwei Untereinheiten. Diese Untereinheiten stammen aus der Rel-Proteinfamilie und bilden Homo- oder Heterodimere. Zu den Mitgliedern der Familie gehören p50 (NFκB1), p52 (NFκB2), Rel-A (p65), Rel-B und cRel. Die am häufigsten vorkommende Form des NFκB ist das Heterodimer aus Rel-A (p65) und p50. Alle Mitglieder der Familie besitzen eine 300 Aminosäuren lange Rel Homologie Domäne, Rel-A, Rel-B und cRel besitzen außerdem eine transaktivierende Domäne. p50 und p52 werden aus den Vorläuferproteinen p105 und p100 durch proteolytischen Abbau gebildet. Über die Spezifität der NFκB-Isoformen ist sehr wenig bekannt. Mäuse mit einer homozygoten Deletion der verschiedenen Rel Gene besitzen jedoch charakteristische Phänotypen (de Martin et al., 1999; Baeuerle und Baltimore, 1996).

p105/p50 ^{-/-} :	Vielfältige Defizite in der Funktion der B-Zellen	(Sen und Baltimore, 1986)
p100/p52 ^{-/-} :	Veränderte Architektur der Lymphknoten	(Weih et al., 1995)
Rel-A ^{-/-} :	Apoptose der Leberzellen, Granulopoiesis, Embryonal lethal	(Beg et al., 1995)
Rel-B ^{-/-} :	Lethal, Entzündungen in vielen Organen	(Weih et al., 1995)
cRel ^{-/-} :	Defizite in der Funktion von B- und T-Zellen	(Kontgen et al., 1995)

Das dominant negative Protein dn-IκB kann auf Grund der Mutation von Serin 32 und 36 zu Alanin nicht mehr phosphoryliert werden (Franek et al., 2001). Da die Maskierung von NFκB nicht aufgehoben werden kann, inhibiert dn-IκB jede DNA-Bindungsaktivität der Proteine der NFκB-Familie vollständig (Baeuerle und Baltimore, 1996).

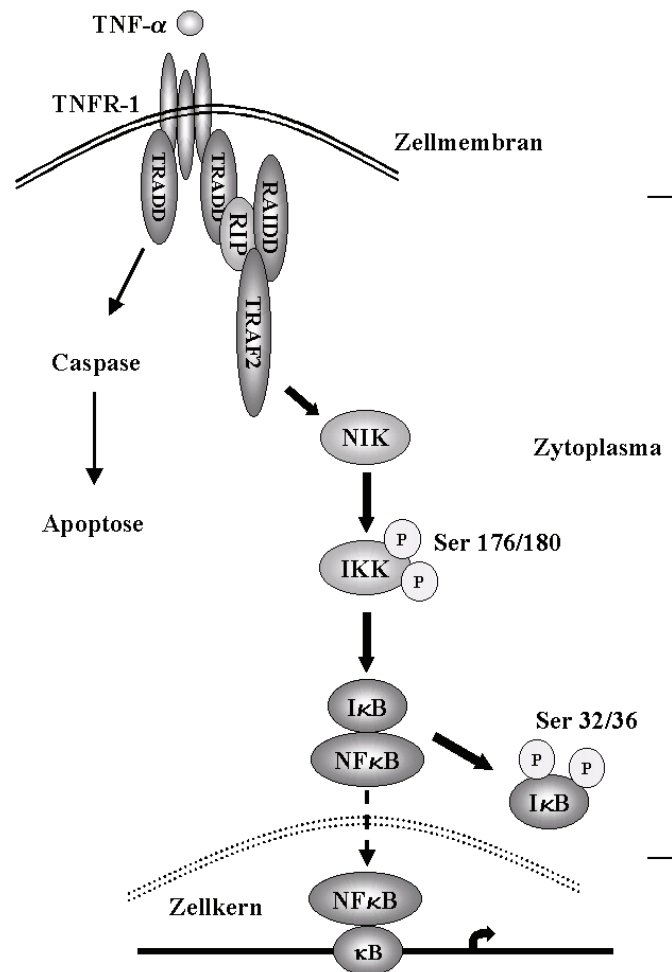


Abbildung 43: Schematische Darstellung des NFκB-Signalwegs. Die Aktivierung des TNF-Rezeptors führt zum proteasomalen Abbau von IκB und zur Translokation von NFκB in den Kern (de Martin et al, 1999).

Um zu überprüfen, ob *H-REV107-1* ein Zielgen von NFκB ist, werden verschiedene Ko-Transfektionen mit dominant-negativem dn-IκB durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit TNF-α erhöht die Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 im Reporter Assay um etwa 50% (Abb. 44). Ko-Transfektionen des NFκB-Inhibitors dn-IκB senken hingegen die Aktivität des Promoters um 50%. Die Aktivität des mit TNF-α behandelten cRel #1 mt Konstrukts, indem das erste der beiden cRel Motive mutiert ist, liegt bei etwa 20% und damit deutlich höher als die Aktivität von 9%, die das gleiche Konstrukt ohne Behandlung mit TNF-α zeigt (Abb. 41). Dies bedeutet möglicherweise, dass die Induktion durch TNF-α über eine zweite Bindungsstelle laufen kann. Allerdings liegt auch die Aktivität des Konstrukts cRel #1 mt, nach Ko-Transfektion von dn-IκB, mit 13% über der Aktivität von 9% des Konstrukts cRel #1 mt. Diese niedrigen Werte bedeuten alle, dass der Promoter unter diesen Umständen keine Aktivität mehr besitzt. Eine weitergehende Interpretation der Daten ist daher nicht seriös. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass die Bindungsstelle cRel #2 die Funktion der Bindungsstelle cRel #1 zumindest teilweise ersetzen kann.

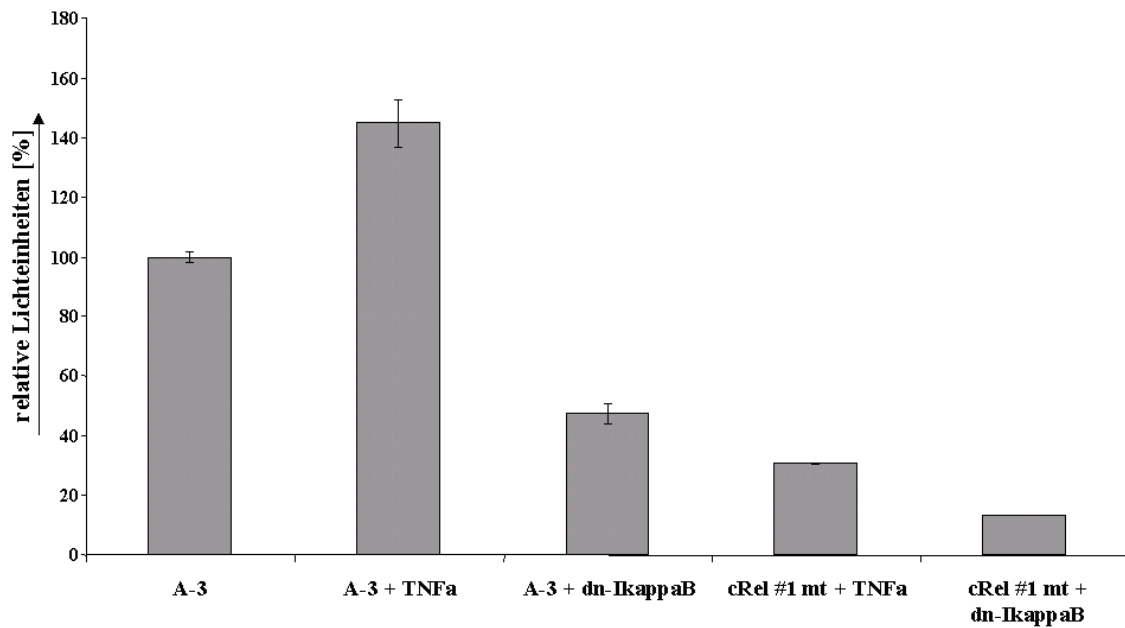


Abbildung 44: Einfluss des TNF- α -Signalweges bzw. des NF κ B-Inhibitors dn-I κ B auf die Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 ohne und mit Mutation der cRel #1 Bindungsstelle. Die Behandlung der Zellen mit 1000 U TNF- α /ml erfolgte für 48 Stunden.

Tabelle 27: Zahlenwerte zum Reporter Assay in unbehandelten oder mit TNF- α (1000U/ml) behandelten NIH3T3 Zellen (Abb. 44). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der weiteren Konstrukte beziehen sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	2
A-3 + TNF- α	145	8
A-3 + dn-IkappaB	47	3
cRel #1 mt + TNF- α	31	0
cRel #1 mt + dn-IkappaB	13	0

3.7.6 Methylierung von A-3

Die Methylierung von CpG-Inseln kann zu einer Inaktivierung einzelner Elemente eines Promoters führen. Daraus kann eine vollständige Suppression der Genexpression resultieren. Da dies auch beim *H-REV107-1* Promoter der Fall sein kann, wird die Promotersequenz mit Hilfe des Analyseprogramms CPGPLOT (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) untersucht. Die vom Programm als überdurchschnittliche CpG-Häufungen erkannten Bereiche sind in der folgenden Sequenz mit fetten Buchstaben dargestellt (Abb. 45). Dies betrifft fast den gesamten Bereich des Promoters. Zur Orientierung sind sowohl der maximale Transkriptionsstartpunkt TSP als auch der Translationsstartpunkt +1 eingezeichnet. Allerdings haben die Northern Blot Hybridisierungsassays keine Suppression der Genexpression durch Methylierung gezeigt, da die Behandlung der Zelllinien OVCAR-3, A27/80, OAW und SKOV-3 mit 5-Aza-2'-Desoxycytidine nicht zur Aufregulation der *H-REV107-1* Expression führt (Abb. 7).

```

- 999 TTTGAGACTGAGTTTCGCTTTGTTGCACAGGCTAGAGTGCAGTGGCGCGA
- 949 TCTTGGCTCACTGCAACCCCCACCTCCCGGGCTCAAGTGATTCTCCTGCC
- 899 TCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCATGCCTCCACGCCCGGCT
- 849 AATTTTTTGCATTTTATAGTAGAGACGGGGTTTCATCGTGTAGCCAGCAT
- 799 GGTCTCGATCTCTTGACCTCGTGATCTGCCCGCCTCGGCCCTCCCAAAGTG
- 749 CTGAGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGCCCGGCCCTTGGTGGTATATTTT
- 699 TAACTCCTTCAGTTTTTAAACTATAAGCCCATTCCTGAGTGAAGCGGAAA
- 649 GTAAACCCATCATGGCCCTGCAGTGTGATGTGTGTGCAGAGGTGAGTGT
- 599 GTGCGACTCCTGGATGCTGGGCGCGCAGGGCATGGGTGAGGCGGGAAGAG
- 549 GCGGTGCCGGGGGCGCGGGCGTCTGCAGTCGCCGGGCTCGGGACCGGGG
- 499 CCGGGCGCTCTGCGAGGCTCTCATTAGCCGGCGGCGCGGGGAGGGGCGG

                                max. TSP
                                ↗
- 449 GTGACCTCACGCCGGCCCGCCACCGCGGCCATTAGACCCGGTCCAATTGC
- 399 TGGGGCTGCAGCGCTGCCTCCGAGACCGCGAAGTGGGTGGATCGGGTCTT
- 349 CCTGGAAGGTGCGATAAGGCCGGGCGAGGTGCCTGGGATGCTTCTCCCT
- 299 TCCGCGAGGAAGAGATCTAATTGGGTAGGGCGGGTGTAGACTAGCCTGCC
- 249 GAGCCGCCGCTGGCACCTGCAGCCTCCTGGGCGCCCGCGGGCCCCGGCG
- 199 AGAAAGTTGTTAAAGGGAGCGAGGTGGTTGTTTCCTGGGGTACGAGGCGCG
- 149 CCTCTACGCCCTGCCCAACAGAAGCCGAGTCCGTGGGGTCTGGAGACG
- 99  CAGTTTCCTTGTTAATGACAATAAATCCCTGCTCCCCCTGCCTCAGACAT

- 49  CTACGCAGCGAAATCGAGCCTGGCCTTGAGGGTCCACACCGCGAGGAAGA +1
+ 2  TGCGTGCGCCCAT

```

Abbildung 45: Analyse der *H-REV107-1* Promotersequenz mit CPGPLOT. Es zeigt sich, dass die gesamte Promotersequenz bis in den 5'-Bereich des Gens hinein sehr CpG-reich ist.

Um zu testen, ob der *H-REV107-1* Promoter überhaupt durch Methylierung inaktiviert werden kann, wird das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 mit Hilfe der Methylase SssI *in vitro* methyliert und anschließend in NIH3T3 Zellen transfiziert. Die Aktivität des methylierten Konstrukts erreicht nur 30% des Wertes des nicht-methylierten Konstrukts A-3 (Abb. 46).

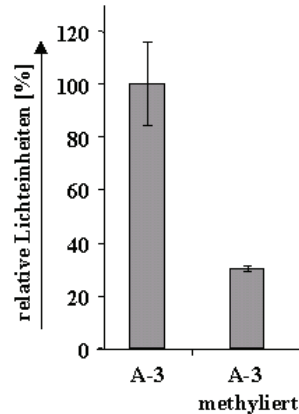


Abbildung 46: Aktivität des, mit der Methylase SssI methylierten, Promoterkonstrukts A-3 methyliert im Vergleich zum nicht methylierten Konstrukt A-3.

Tabelle 28: Zahlenwerte zum Reporter Assay in NIH3T3 Zellen (Abb. 46). Der Wert für das Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte des methylierten A-3 Konstrukts bezieht sich auf diese 100%.

Konstrukt	Aktivität (%)	Standardabw. (%)
A-3	100	16
A-3 methyliert	30	1

Dies zeigt, dass eine Methylierung des Promoters möglich ist und dass dies zu einer Inaktivierung der Genexpression führen kann. Diana Busch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jörn Walter (Saarbrücken) untersucht den Methylierungsstatus des ersten Introns des *H-REV107-1* Gens. Die Zelllinien HOSE, OAW42 sowie Proben aus humanem Blut zeigen keine relevante Methylierung des ersten Introns. In der Zelllinie OVCAR-3 hingegen ist das erste Intron an allen CpG-Inseln methyliert. Eine weiterführende Untersuchung des Methylierungsgrades des *H-REV107-1* Promoters in verschiedenen Zelllinien steht noch aus.

Die verschiedenen Experimente mit dem Dualen Luciferase System zeigen die funktionelle Bedeutung einiger Bindungsstellen im H-REV107-1 Promoter. Die cRel #1 Bindungsstelle ist für die Aktivität des Promoters sehr wichtig. Dies zeigt der hohe Aktivitätsverlust nach Mutation der Bindungsstelle. Des weiteren aktiviert die Behandlung mit TNF- α , einem Aktivator des NF κ B-Signalwegs, die Gesamtpromoter Aktivität. Ein weiteres, wichtiges Element des Promoters ist die CREB Bindungsstelle. Die Mutation dieser Bindungsstelle führt ebenfalls zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des Promoterkonstrukts.

Die STAT Bindungsstelle zeigt im Dualen Reporter Assay keine funktionelle Bedeutung für die Promoteraktivität. Bei der IRF-1/ISRE Bindungsstelle scheint es sich um Repressor Element zu handeln. Sowohl die Deletion als auch die Mutation dieser Bindungsstelle führt zu einer Aktivitätssteigerung des Promoterkonstrukts, d.h. die durch IFN- γ beobachtete mRNA Expression des *H-REV107-1* Gens lässt sich mit transienten Promoter Assays nicht nachvollziehen.

3.8 Analyse der promoterbindenden Transkriptionsfaktoren

Nachdem jetzt die potentiellen, funktionellen Bereiche des Promoters definiert sind, sollen die an diese Elemente bindenden Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Zur Analyse dieser *in vitro* an den Promoter bindenden Proteine wird ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt. Bei diesem werden die gesammelten Kernproteine einer Zelllinie mit ³²P-markierten DNA-Abschnitten, auf denen sich die Sequenz für eine Transkriptionsfaktorbindungsstelle befindet, inkubiert. Sollten sich im Zellkern Transkriptionsfaktoren befinden, die an diese Bindungsstelle binden, so trennt sich in einem Polyacrylamidgel der entstandene Komplex auf Grund seiner geringeren Laufgeschwindigkeit von den ungebundenen Oligonukleotiden ab.

Tabelle 29: Übersicht über die im Verlauf der Experimente verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Quelle		
CREB (H-REV107-1)	GAG GGG CCG GGT GAC CTC ACG CCG GCC CGC CAC	aus	der	H-REV107-1 Promotersequenz
CREB mutiert (H-REV107-1)	GAG GGG CCG GGT GCC CGC ACG CCG GCC CGC CAC	aus	der	H-REV107-1 Promotersequenz
CREB (Literatur)	AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG	Zhang et al., 2004		
cRel (H-REV107-1)	GTG GAT CGG GTC TTC CTG GAA GGT GCG ATA AG	aus	der	H-REV107-1 Promotersequenz
cRel mutiert (H-REV107-1)	GTG GAT CTG GTC TTC ATG GAA GGT GCG ATA AG	aus	der	H-REV107-1 Promotersequenz
NFκB (Literatur)	GAT GAC ACC TGG GGA ATT CCC ACA CGG AGC AGG	Wang et al., 2001		
STAT1α (Literatur)	TAC TTT CAG TTT CAT ATT ACT CTA	De Saint et al., 2000		
STAT1 / STAT3 (Literatur)	CGT CGA CAT TTC CCG TAA ATC A	Ward et al., 1999		
STAT1 / STAT 5 (Literatur)	AGA TTT CTA GGA ATT CAA TCC	Ward et al., 1999		

Auf Grund der Ergebnisse der Reporter Assays werden die Bindungsstellen für cRel und CREB-1 ausgewählt, um in einem Electrophoretic Mobility Shift Assay untersucht zu werden. Mit diesem soll geprüft werden, ob *in vitro* Transkriptionsfaktoren an diese DNA-Sequenzen binden. Da das im EMSA benutzte cRel-Oligonukleotid nicht nur die beiden cRel Bindungsstellen, sondern auch die überlappende, potentielle STAT-Bindungsstelle beinhaltet, werden die aus der Literatur bekannten STAT-Bindungsstellen als Kontrolle im EMSA eingesetzt. Das Oligonukleotid, das die beiden cRel Bindungsstellen des *H-REV107-1* Promoters enthält, wird so im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen NFκB- und STAT-Bindungsstellen getestet. Außerdem wird das Oligonukleotid, das die CREB Bindungsstelle des *H-REV107-1* Promoters beinhaltet, im Vergleich zu einer in der Literatur beschriebenen CREB Bindungsstelle getestet.

Die bisherigen, für die Bindungsstellen im *H-REV107-1* Promoter benutzten Bezeichnungen cRel und CREB-1 beruhen auf der Analyse der Software MatInspector. Ob die Kernproteine cRel bzw. CREB-1 tatsächlich an diese Sequenzmotive binden, sollen die weiteren in diesem Kapitel beschriebenen Versuche zeigen.

Neben den Kernextrakten unbehandelter NIH3T3 Zellen werden auch Kernextrakte aus Zellen gesammelt, die zuvor mit TNF-α bzw. cAMP inkubiert worden sind. Diese Behandlung soll die Signalwege aktivieren und zu einer verstärkten Bindung der Kernproteine an die DNA führen. TNF-α sollte die Bindung von NFκB (inklusive der Untereinheit cRel) und cAMP die Bindung von CREB-1 an die DNA aktivieren. Ob die Kernproteine aus unbehandelten oder behandelten Zellen gewonnen wurden, ist unterhalb der jeweiligen Abbildung vermerkt.

3.8.1 Analyse der potentiellen cRel-Bindungsstelle

Die Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse zweier Electrophoretic Mobility Shift Assays. Die verschiedenen Banden zeigen die radioaktiv markierten Oligonukleotide, die von Kernproteinen gebunden wurden. Die Signale kann man als Bandenmuster der jeweiligen Kernextrakte in Kombination mit den verwendeten Oligonukleotiden lesen. Im Versuch zur Abbildung 47a) wurden Kernproteine unbehandelter Zellen und in Abbildung 47b) Kernproteine TNF-α behandelter Zellen verwendet. Die Behandlung der Zellen mit TNF-α führt im Fall des Oligonukleotids NFκB zu einer Veränderung des Bandenmusters. Das Signal, welches bei den unbehandelten Zellen am unteren Rand des Gels sichtbar ist, verschwindet im Experiment der mit TNF-α behandelten Zellen. Dafür ist hier das sich weiter oben befindende Signal sehr viel stärker als im Vergleich zu dem Experiment mit den unbehandelten Zellen. Die aus dem Oligonukleotid cRel (*H-REV107-1*) und den Kernproteinen gebildeten Komplexe zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Experimenten der TNF-α behandelten und den unbehandelten Zellen. Auch die mit den verschiedenen STAT-Oligonukleotiden durchgeführten Experimente zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrem Bandenmuster.

Wäre das Bandenmuster der Spur cRel (*H-REV107-1*) mit einem der Bandenmuster der anderen Spuren identisch, so könnte man schlussfolgern, dass in diesen Fällen die selben Kernproteine an die Oligonukleotide binden.

Da die bindenden Kernproteine für die, aus der Literatur entnommenen, Oligonukleotidsequenzen bekannt sind, hätte man die Suche nach den an die Sequenz cRel (H-REV107-1) bindenden Kernproteine bereits einschränken können.

In den verschiedenen Spuren zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in den Bandenmustern der Protein-Oligonukleotid Komplexe. Dies ist aber nicht überraschend, da die dem Promoter entnommene und die aus der Literatur bezogenen Sequenzen unterschiedlich sind. Es lässt sich annehmen, dass an die unterschiedlichen Sequenzen auch unterschiedliche Kernproteine binden. Bereits ein kleiner Unterschied in der Sequenz kann das Bindungsvermögen von einem Mitglied einer Transkriptionsfaktorenfamilie zu einem anderen Mitglied der selben Familie verschieben. Obwohl durch TNF- α Zugabe die Aktivität des *H-REV107-1* Promoter deutlich gesteigert wird, lässt sich in den EMSA Experimenten kein verändertes, TNF- α abhängiges Bandenmuster erkennen.

In weiteren Versuchen wird genauer untersucht, ob und welche Mitglieder der NF κ B-Familie an die Bindungsstelle des *H-REV107-1* Promoters binden.

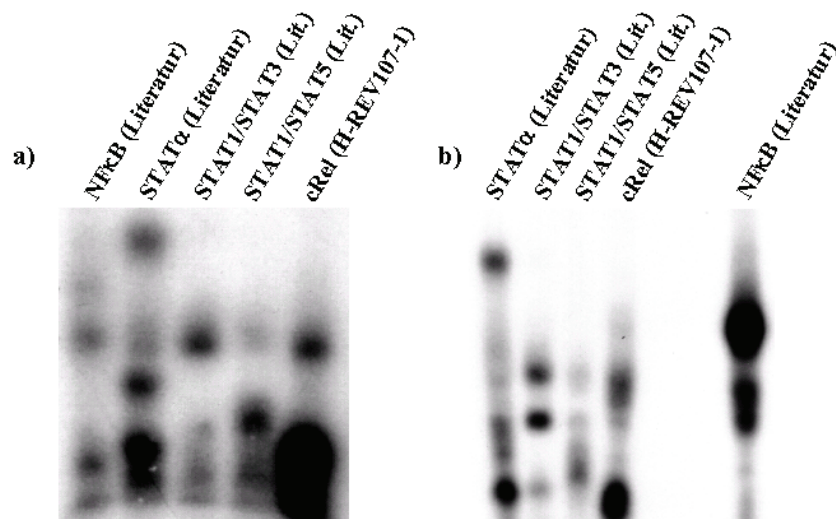


Abbildung 47: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 10 μ g Kernproteine a) unbehandelter NIH3T3 Zellen bzw. b) mit 500 U/ml TNF- α behandelter NIH3T3 Zellen auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten.

3.8.2 Nachweis der Spezifität der Protein-Oligonukleotid Bindung durch Kompetition mit unmarkierten Oligonukleotiden und durch den Einsatz mutierter Oligonukleotide

Ob Kernproteine spezifisch nur an eine bestimmte Sequenz binden, oder ob nicht das selbe Kernprotein unspezifisch an verschiedene Sequenzen bindet, lässt sich feststellen, indem man einen Überschuss an unmarkierten, spezifischen oder unspezifischen Oligonukleotiden als Kompetitoren einsetzt.

Wird ein unmarkiertes Oligonukleotid in großem Überschuss eingesetzt, so werden die Kernproteine proportional zum verwendeten Verhältnis unmarkiertes zu markiertem Oligonukleotid an dieses binden, da die Kernproteine nicht zwischen unmarkierten und markierten Oligonukleotiden unterscheiden. Die gebildeten Komplexe aus Kernprotein und unmarkiertem Oligonukleotid sind auf Grund des fehlenden ^{32}P auf dem Röntgenbild nicht zu sehen, die entsprechende Bande verschwindet. Dieses Verfahren wird nun benutzt, um die Spezifität der verschiedenen Signale innerhalb einer Spur zu überprüfen. Das Ergebnis ist in Abb. 48 dargestellt. Die erste Spur cRel (H-REV107-1) zeigt das Bandenmuster der gebildeten Kernprotein-cRel (H-REV107-1) Oligonukleotid Komplexe. Es ist eine deutliche Bande zu sehen. In der dritten Spur cRel (H-REV107-1) + Kompetitor NFκB (Literatur) wird untersucht, ob sich diese Bande durch den Einsatz des Kompetitors NFκB (Literatur) verdrängen lässt. Dies ist nicht der Fall. Das bedeutet, die an die Sequenz des Oligonukleotids cRel (H-REV107-1) bindenden Kernproteine binden nicht an die Sequenz des Oligonukleotids NFκB (Literatur). In der darauf folgenden Spur cRel (H-REV107-1) + Kompetitor (H-REV107-1) wird als positive Kontrolle gezeigt, dass die Bindung der Kernproteine an das radioaktiv markierte Oligonukleotid cRel (H-REV107-1) von dem identischen, unmarkierten Oligonukleotid cRel (H-REV107-1) verdrängt wird.

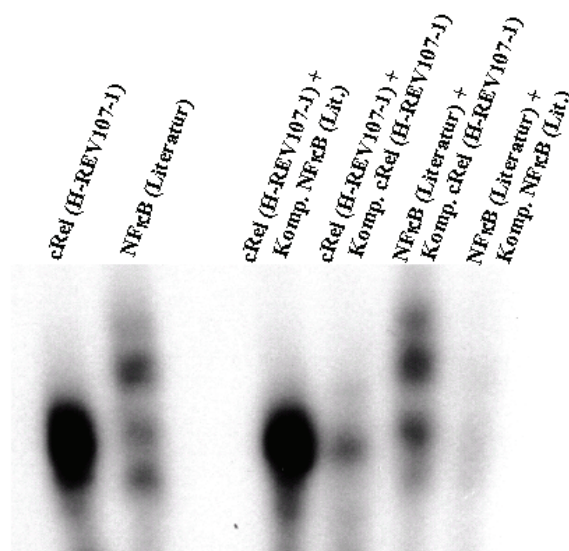


Abbildung 48: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 7 µg Kernproteine unbehandelter NIH3T3 Zellen auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. Die Kompetitoren sind im 100-fachen Überschuss eingesetzt worden.

In einem weiteren Ansatz wird der Umkehrschluss überprüft. In der zweiten Spur NFκB (Literatur) führt die Bindung der Kernproteine an das Oligonukleotid NFκB (Literatur) zu vier, relativ schwachen Signalen. Durch den Einsatz des Kompetitors cRel (H-REV107-1) in der Spur NFκB (Literatur) + Kompetitor cRel (H-REV107-1) werden diese Banden nicht ausgelöscht, d.h. das Oligonukleotid NFκB (Literatur) wird nicht aus seinem Komplex mit den Kernproteinen gedrängt.

Die Positiv-Kontrolle ist in der Spur NFκB (Literatur) + Kompetitor NFκB (Literatur) zu sehen. Hier sind keine Banden mehr zu sehen, da der Überschuss an unmarkierten Oligonukleotid NFκB (Literatur) das radioaktiv markierte Oligonukleotid NFκB (Literatur) aus den Komplexen mit den Kernproteinen verdrängt. Diese Experimente zeigen klar, dass die Oligonukleotide cRel (H-REV107-1) und NFκB (Literatur) von verschiedenen Kernproteinen gebunden werden, da jeweils das eine Oligonukleotid nicht in der Lage ist, das jeweils andere Oligonukleotid aus dessen Oligonukleotid-Kernprotein Komplex zu verdrängen.

3.8.3 Analyse der potentiellen CREB-Bindungsstelle

Die gleichen Experimente, die die Bindung von Kernproteinen an die Sequenz des Oligonukleotids cRel (H-REV107-1) nachweisen konnten, werden jetzt mit dem Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) durchgeführt. Das der *H-REV107-1* Promotersequenz entsprechende CREB (H-REV107-1) Oligonukleotid wird mit dem, in der Literatur als Bindungsmotif für den Transkriptionsfaktor CREB-1 beschriebenen, Oligonukleotid CREB (Literatur) verglichen.

Die Ergebnisse zweier EMSA Assays sind in Abbildung 49 dargestellt. Während in dem Experiment zur Abbildung 49a) die Kernproteine unbehandelter NIH3T3 Zellen verwendet werden, ist in der Abbildung 49b) das Ergebnis der Bindung von Kernproteinen aus mit cAMP behandelten NIH3T3 Zellen an die entsprechenden Oligonukleotide zu sehen. In beiden Fällen sieht man deutliche Unterschiede zwischen den Bandenmustern der Oligonukleotid-Kernprotein Komplexe.

Das Bandenmuster des Oligonukleotids CREB (Literatur) zeigt zwei, das Bandenmuster des Oligonukleotids CREB (H-REV107-1) drei Signale, wobei auch die Positionen der einzelnen Signale unterschiedlich sind. Dies zeigt, dass die Oligonukleotide CREB (H-REV107-1) und CREB (Literatur) von Kernproteinen verschiedener Größe gebunden werden. Auf Grund der deutlich unterschiedlichen Signale ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich bei dem an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) bindende Kernprotein nicht um CREB-1 handelt. Die Behandlung der Zellen mit cAMP führt im Fall des CREB (Literatur) Oligonukleotids zu keiner Veränderung der Signale. In beiden Experimenten (behandelt und unbehandelt), sieht man zwei in etwa gleich starke Signale. Beim Einsatz des CREB (H-REV107-1) Oligonukleotids bewirkt die vorausgegangene Behandlung der Zellen mit cAMP eine Verschiebung der Signalintensität. In dem Experiment, bei dem Kernextrakte unbehandelter Zellen verwendet wurden, zeigen die beiden unteren Banden ein Signal gleicher Intensität, die obere Bande ein Signal mit einer etwas schwächeren Intensität. Die Verwendung von Kernextrakt aus cAMP-behandelten Zellen führt zu einer stärkeren Signalintensität der oberen Bande, während die mittlere Bande eine schwächere Intensität zeigt. Die Signalstärke der unteren Bande bleibt unverändert.

In weiteren Versuchen wird genauer untersucht, ob und welche Mitglieder der CREB-Familie an die Bindungsstelle des *H-REV107-1* Promoters binden.

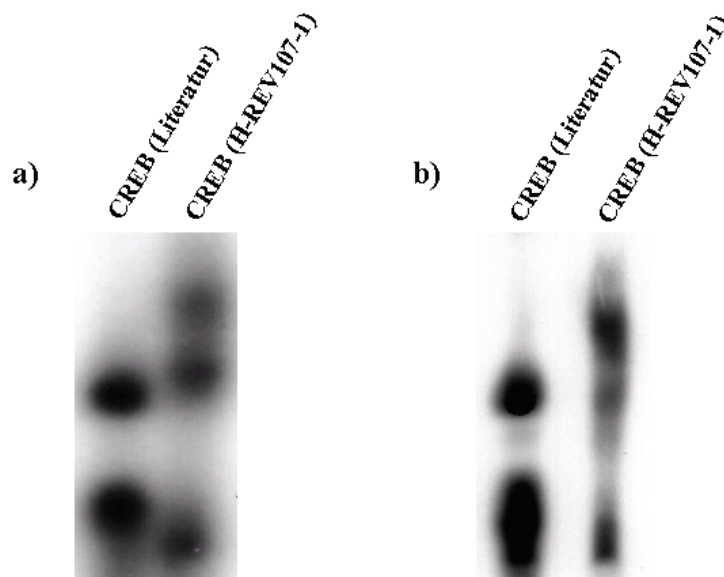


Abbildung 49: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 10 µg Kernproteine a) un behandelter NIH3T3 Zellen oder b) cAMP behandelter Zellen (Endkonzentration: 200 µmol) auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten.

3.8.4 Nachweis der Spezifität der Protein-Oligonukleotid Bindung durch Kompetition mit unmarkierten Oligonukleotiden sowie durch den Einsatz mutierter Oligonukleotide

Jetzt wird untersucht, ob die hier bindenden Kernproteine eine spezifische Bindung an die Oligonukleotid-Sequenz eingehen, oder ob es sich um eine unspezifische Bindung handelt. Dazu werden die Oligonukleotide CREB (Literatur) und CREB (H-REV107-1) jeweils mit unmarkierten Kompetitoren und Kernproteinextrakt inkubiert. Dabei wird überprüft, ob das Oligonukleotid CREB (Literatur) in der Lage ist, die Kernproteine aus der Bindung an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) zu verdrängen. Wäre dies der Fall, so wäre die Bindung der Kernproteine an die Sequenz CREB (H-REV107-1) nicht spezifisch bzw. würden die selben Kernproteine an die beiden Oligonukleotide binden. Als positive Kontrolle soll das unmarkierte Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) die Bindung der Kernproteine an das markierte Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) unterbinden. Die Verwendung des Oligonukleotids CREB mutiert (H-REV107-1) ergibt eine zusätzliche, negative Kontrolle.

Da die Basen, die laut Analyse-Software MatInspector spezifisch für die Bindung des Oligonukleotids an die Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie sein sollen, so mutiert sind, dass das Programm keine Bindung mehr voraussagt, sollte dieser Kompetitor auch nicht in der Lage sein, die Bindung zwischen CREB (H-REV107-1)

und den Kernproteinen zu stören. Die Einführung der selben Mutationen in die im Reporter-Assay verwendeten Konstrukte, führte zu einer Abnahme der Promoteraktivität um 63%.

Abbildung 50a) zeigt das Ergebnis dieser Experimente. In den ersten vier Spuren wird das markierte Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) eingesetzt. Die erste Spur zeigt die Bindung der Kernproteine an das Oligonukleotid. In der zweiten Spur wird als Kompetitor das unmarkierte Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) verwendet. Als Folge dessen verschwindet eine Bande vollständig (oberer Pfeil), eine zweite Bande ist nur noch schwach zu sehen (unterer Pfeil).

In der nächsten Spur sieht man das Ergebnis nach Verwendung des mutierten Oligonukleotids CREB mt (H-REV107-1) als Kompetitor. Hier verschwindet keine Bande vollständig, da die Kernproteine offenbar deutlich schlechter an das mutierte Oligonukleotid binden. In der vierten Spur sind ebenfalls alle Banden zu sehen. Es findet keine Verdrängung durch den Kompetitor CREB (Literatur) statt.

Die nächsten vier Spuren zeigen das Ergebnis des umgekehrten Versuchansatzes. Hier wird als markiertes Oligonukleotid das Oligonukleotid CREB (Literatur) eingesetzt und durch Zugabe verschiedener Kompetitoren die Spezifität der Bindung der Kernproteine an dieses Oligonukleotid untersucht.

Das Bandenmuster, das in der fünften Spur die Bindung der Kernproteine an das Oligonukleotid CREB (Literatur) zeigt, unterscheidet sich deutlich vom Bandenmuster der Bindung der Kernproteine an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1). Es binden verschiedene Kernproteine an die beiden Oligonukleotide. Dies wird durch die weiteren Ergebnisse bestätigt. Die Verwendung des Kompetitors CREB (Literatur) führt zu einer deutlich schwächeren Bande im Bandenmuster (Pfeil rechts, sechste Spur). Wird der Kompetitor CREB (H-REV107-1) eingesetzt (siebte Spur), so ist die Bande wieder deutlich zu sehen.

Dies belegt, dass die Oligonukleotide CREB (Literatur) und CREB (H-REV107-1) von verschiedenen Kernproteinen gebunden werden. Die letzte Spur zeigt das Ergebnis nach Verwendung des Kompetitors CREB mt (H-REV107-1). Dass auch hier keine Banden verschwinden, d.h. die Bindung der Kernproteine an das markierte Oligonukleotid CREB (Literatur) nicht gestört wird, dient als *in vitro* Beweis dafür, dass durch die eingeführten Mutationen keine neuen Bindungsstellen entstanden sind, an die jetzt die Kernproteine binden könnten. Dies entspricht der Aussage der Analyse-Software MatInspector.

In Abbildung 50b) ist gezeigt, welche Unterschiede durch die Verwendung des Wildtyp bzw. des mutierten Oligonukleotids CREB (H-REV107-1) entstehen. Beim Einsatz des mutierten Oligonukleotids CREB mt (H-REV107-1) (linke Spur) verschwinden im Vergleich zum nicht mutierten CREB (H-REV107-1) Oligonukleotid (rechte Spur) zwei Banden (Pfeile).

Diese Banden entsprechen den Kernproteinen, die genau an die Basen binden, die mutiert wurden. Dies sind die selben Basen, deren Mutation zu der zuvor beschriebenen Abnahme der Promoteraktivität im Reporter Assay geführt haben. Das bedeutet, dass die hier bindenden Kernproteine mit hoher Wahrscheinlichkeit die Transkriptionsfaktoren sind, die im Reporter Assay auf Grund der eingeführten Mutationen nicht mehr binden konnten und so zum beobachteten Verlust der Promoteraktivität beitrugen.

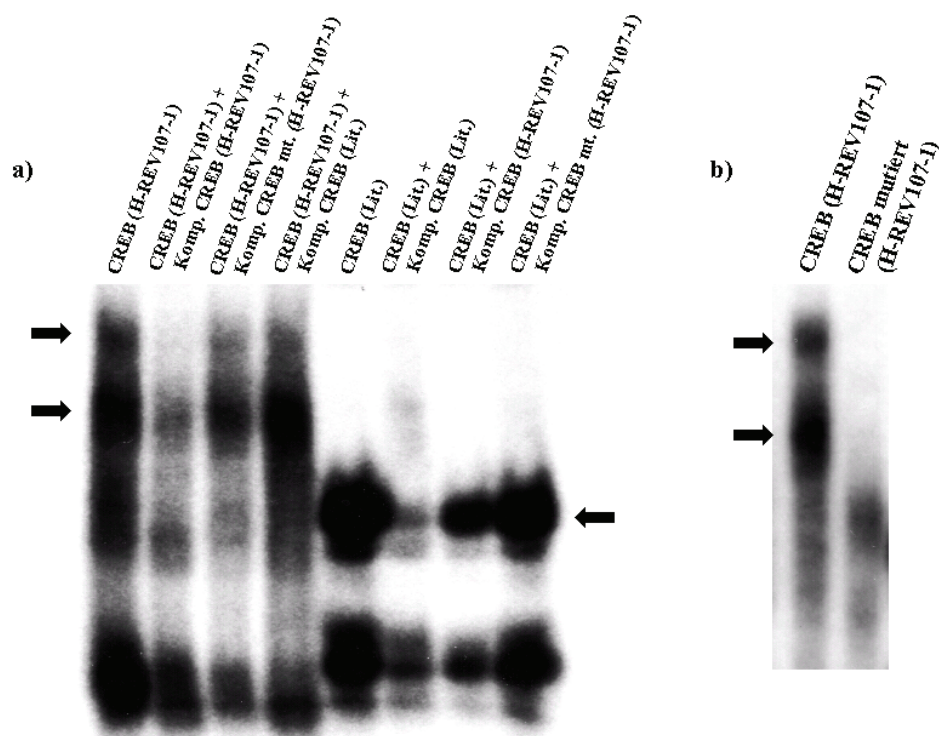


Abbildung 50: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 10 µg Kernproteine unbehandelter NIH3T3 Zellen auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. a) Kompetitoren sind im 100fachen Überschuss eingesetzt. Die Pfeile zeigen auf die Spots der radioaktiven, gebundenen Oligonukleotide, die durch Einsatz nicht-markierter, identischer Oligonukleotide, aber nicht durch den Einsatz nicht-markierter, mutierter bzw. unspezifischer Oligonukleotide verdrängt werden. b) Die Pfeile zeigen auf die Banden, die bei Verwendung des mutierten Oligonukleotids CREB mt (H-REV107-1) verschwinden.

Die bisher mittels EMSA durchgeführten Experimente führen zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Die Sequenzmotive für die Transkriptionsfaktorbindungsstellen cRel und CREB, die der Sequenz des *H-REV107-1* Promoters entnommen sind, binden Kernproteine aus NIH3T3 Zellen. Bei dem Kernprotein, das an die Transkriptionsfaktorbindungsstelle CREB bindet, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um CREB-1, da die Bandenmuster für CREB (H-REV107-1) und CREB (Literatur) deutliche Unterschiede aufweisen und bekannt ist, dass an das Oligonukleotid CREB (Literatur) das Kernprotein CREB-1 bindet. Dies wird durch die Experimente mit Kompetitoren bestätigt, da der Kompetitor CREB (Literatur) nicht die Bindung von Kernproteinen an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) und der Kompetitor CREB (H-REV107-1) nicht die Bindung der Kernproteine an das Oligonukleotid CREB (Literatur) beeinflusst. Für cRel sehen die Ergebnisse ähnlich aus. In der Literatur ist keine cRel-spezifische Bindungsstelle beschrieben, so dass hier als Vergleich die in der Literatur beschriebene Bindungsstelle für NFκB benutzt wird.
- 2) Das Oligonukleotid cRel (H-REV107-1) beinhaltet neben den beiden cRel Bindungsstellen auch eine überlappende Bindungsstelle für STAT-1. Da sich in Northern Blot Hybridisierungsassays gezeigt hat, dass die Expression des Gens *H-REV107-1* durch IFN-γ induziert werden kann, soll eine mögliche Funktionalität dieser Bindungsstelle nicht ausgeschlossen werden, auch wenn sich diese im Reporter Assay nicht gezeigt hat. Daher wird das Bandenmuster des Oligonukleotids cRel (H-REV107-1) mit den Bandenmustern der in der Literatur beschriebenen Oligonukleotide für NFκB und den verschiedenen Mitgliedern der STAT-Familie verglichen. Es zeigt sich keine Übereinstimmung. Auch ist das als Kompetitor eingesetzte NFκB (Literatur) Oligonukleotid nicht in der Lage, die Bindung des Oligonukleotids cRel (H-REV107-1) an das Kernprotein zu verdrängen.
- 3) Im nächsten Schritt sind mutierte CREBmt (H-REV107-1) Oligonukleotide verwendet worden. Dieses wird von den Kernproteinen, die das nicht-mutierte CREB (H-REV107-1) Oligonukleotid gebunden haben, nicht erkannt. Der Austausch der entsprechenden Basen führt in der Analysesoftware MatInspector dazu, dass die Sequenz nicht mehr als CREB Bindungsstelle identifiziert wird, im Reporter Assay zu einem Verlust der Promoteraktivität von über 60 % und im EMSA zur Abwesenheit der Kernprotein-Oligonukleotid-Komplexe, die bei Verwendung des Oligonukleotids CREB (H-REV107-1) zu sehen sind.

Ob cRel oder ein anderes Mitglied der NFκB-Familie bzw. welches Mitglied der CREB-Familie an die verwendeten Sequenzmotive binden, soll mit Hilfe von Antikörpern und dem hierbei zu beobachtenden „Supershift“ geklärt werden.

3.8.5 Identifizierung *in vitro* bindender Proteine mit Hilfe von Antikörpern

Zur genauen Identifizierung der gebundenen Kernproteine wird dem Kernprotein-Oligonukleotid Gemisch jeweils ein spezifischer Antikörper zugegeben. Der Antikörper bindet je nach Spezifität ein oder mehrere Mitglieder einer Proteinfamilie. Wenn es zu einer Bindung des Komplexes an den Antikörper und damit zu einem Nachweis für die Identität des darin gebundenen Kernproteins kommt, zeigt sich das durch einen so genannten „Supershift“ des Spots. Dieser ergibt sich daraus, dass der Kernprotein-Antikörper-Oligonukleotid Komplex deutlich größer ist als der Kernprotein-Oligonukleotid Komplex. Daher bewegt sich dieser Komplex langsamer durch das Gel und zeigt im Verhältnis zum DNA-Protein Komplex ohne Antikörper ein nach oben verschobenes Signal.

Tabelle 30: Zum spezifischen Nachweis gebundener Transkriptionsfaktoren eingesetzte Antikörper

Name	Hersteller	Spezifität
cRel (C)	Santa Cruz	cRel (p75)
NFκB p65 (A)	Santa Cruz	NFκB (p65) = Rel A
cRel (N)	Santa Cruz	cRel (p75)
NFκB p65	Cell Signalling	p65, p50
NFκB p52	Upstate	p52
NFκB p50	Upstate	p50
RelB	Santa Cruz	RelB (p68)
cRel 272X	Santa Cruz	cRel (p75), NFκB (p65)
CREB-1 sc-186X	Santa Cruz	CREB-1 (p43), ATF-1, CREM-1
ATF-2 sc-6233X	Santa Cruz	ATF-2
ATF-3 sc-188X	Santa Cruz	ATF-3

3.8.5.1 Identifizierung der die cRel Bindungsstelle bindenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern der NFκB Familie

Die Oligonukleotide cRel (H-REV107-1) und NFκB (Literatur) werden mit Kernextrakt und verschiedenen Antikörpern inkubiert. Die Abbildung 51a) zeigt das Ergebnis der Inkubation mit den Antikörpern cRel (C) und NFκB p65 (A).

Im Vergleich zur Inkubation ohne Antikörper (erste Spur; cRel (H-REV107-1)) zeigt die Inkubation des Oligonukleotid-Kernprotein Komplexes cRel (H-REV107-1) mit den Antikörpern cRel (C) und NFκBp65 (A) keinen Supershift (zweite bzw. dritte Spur). Im Fall des Oligonukleotids NFκB (Literatur) kommt es mit beiden Antikörpern zu einem Supershift.

Das bedeutet, dass die von den beiden Antikörpern erkannten Proteine cRel p75 und NFκB p65 an die NFκB (Literatur) Sequenz, aber nicht an die cRel (H-REV107-1) Sequenz binden.

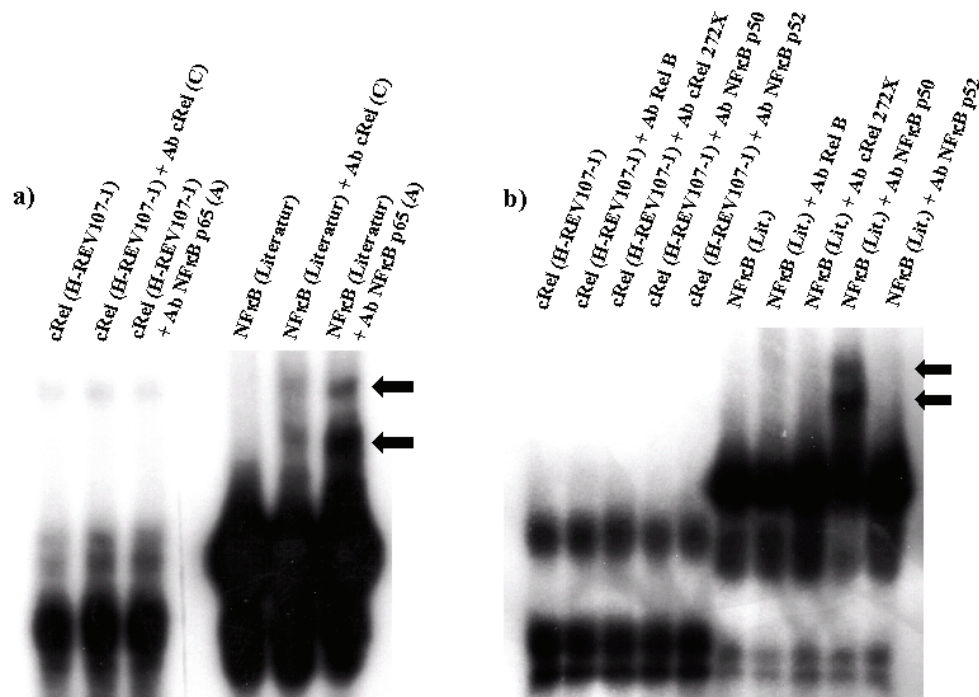


Abbildung 51: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 10 µg Kernproteine unbehandelter NIH3T3 Zellen auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. Die Pfeile zeigen auf „Supershifts“, die auf die Bindung spezifischer Antikörper an die Oligonukleotid-Kernprotein Komplexe beruhen.

Beim nächsten EMSA Assay werden die Oligonukleotide cRel (H-REV107-1) und NFκB (Literatur) mit den Antikörpern RelB, cRel 272X, NFκB p50 und NFκB p52 inkubiert (Abb.51b). Der cRel (H-REV107-1) Oligonukleotid-Kernprotein Komplex zeigt mit keinem dieser Antikörper der NFκB-Familie eine Wechselwirkung und damit auch keinen „Supershift“ (zweite bis fünfte Spur). Der NFκB (Literatur) Oligonukleotid-Kernprotein Komplex zeigt mit dem Antikörper NFκB p50 (neunte Spur; NFκB (Literatur) + Ab NFκB p50) einen deutlichen Supershift. Mit den Antikörpern RelB (siebte Spur) und cRel (achte Spur) kommt es zu sehr schwachen Supershifts. Es wird deutlich, dass keiner der, zur Verfügung stehenden und getesteten, Antikörper aus der NFκB-Familie an den Komplex aus Kernproteinen und dem Oligonukleotid cRel (H-REV107-1) bindet.

3.8.5.2 Identifizierung der die CREB-Bindungsstelle bindenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern der CREB-Familie

Um herauszufinden, welches Kernprotein *in vitro* an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) bindet, werden die Oligonukleotid-Kernprotein Komplexe mit verschiedenen Antikörpern der CREB-Proteinfamilie inkubiert.

Die Abbildung 52 zeigt das Ergebnis eines Experiments, in dem die Oligonukleotide CREB (H-REV107-1) und CREB (Literatur) nur mit Kernproteinextrakt oder mit Kernproteinextrakt und den Antikörpern, die spezifisch gegen CREB-1, CREM-1, ATF-1, ATF-2 und ATF-3 gerichtet sind, inkubiert werden. Der Antikörper gegen CREB-1 erkennt auch die Proteine CREM-1 und ATF-1.

Im Fall des Oligonukleotids CREB (H-REV107-1) führt die Zugabe des spezifischen Antikörpers ATF-2 zu einem deutlichen „Supershift“ (dritte Spur; CREB (H-REV107-1) + Ab ATF-2 6233X). der geschlossene Pfeil zeigt auf die neue Bande, die auf dem „Supershift“ beruht. Der offene Pfeil zeigt den spezifischen Oligonukleotid-Kernprotein Komplex. Dieses Signal wird, auf Grund der Bindung des Antikörpers, weiter nach oben verschoben. Bei dem Kernprotein, das an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) bindet, handelt es sich also um ATF-2. Die Inkubation des Oligonukleotid-Kernprotein Komplexes mit den Antikörpern CREB-1 (zweite Spur) und ATF-3 (vierte Spur) führt zu keiner Veränderung des Bandenmusters. Diese Transkriptionsfaktoren binden nicht an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1).

Im Falle des Oligonukleotids CREB (Literatur) (fünfte bis achte Spur) zeigt sich keine Veränderung des Bandenmusters durch die Zugabe der Antikörper.

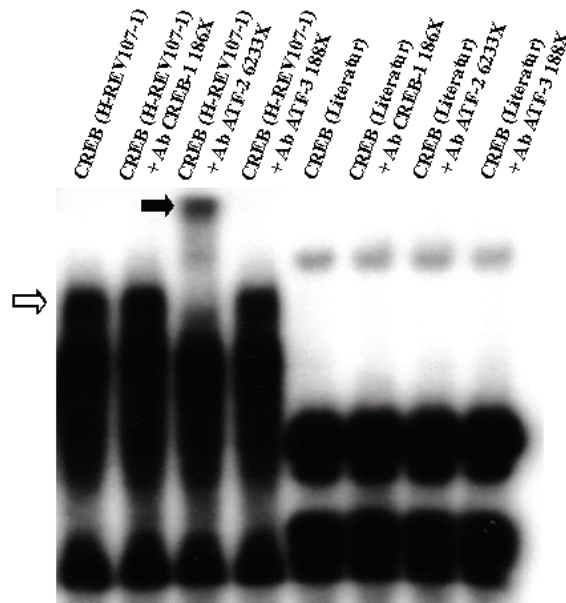


Abbildung 52: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 10 µg Kernproteine cAMP behandelter NIH3T3 Zellen (Endkonzentration: 200 µmol) auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. Der geschlossene Pfeil zeigt auf den „Supershift“, der auf der Bindung des für ATF-2 spezifischen Antikörper an den Oligonukleotid-Kernprotein Komplex beruht. Der offene Pfeil zeigt den spezifischen Oligonukleotid-Kernprotein Komplex (ohne dem gebundenen Antikörper).

Bei einer Wiederholung des Experiments wird neben dem Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) und CREB (Literatur) auch das mutierte Oligonukleotid CREB mt (H-REV107-1) verwendet und die bisherigen Ergebnisse in einem Experiment zusammengefasst. Die Abbildungen 53a) und 53b) zeigen die Ergebnisse der gleichen Versuchsansätze in der gleichen Reihenfolge, in 53a aus unbehandelten, in 53b aus cAMP-behandelten Zellen. In der ersten Spur sieht man das Bandenmuster, das durch Bindung der Kernproteine an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) entsteht. Der Einsatz des in der Bindungssequenz mutierten Oligonukleotids CREB mt (H-REV107-1) führt zum Verschwinden der Banden, da die Kernproteine nicht mehr an das Oligonukleotid binden. Die beiden offenen Pfeile links neben der ersten Spur zeigen auf die beiden Signale, die bei der Verwendung des mutierten Oligonukleotids CREB mt (H-REV107-1) nicht mehr zu sehen sind.

Die dritte und die fünfte Spur zeigen die Ergebnisse nach Inkubation der Oligonukleotid-Protein Komplexe mit den Antikörpern die gegen die Proteine CREB-1, ATF-1, CREM-1 (dritte Spur) und ATF-3 (fünfte Spur) gerichtet sind. Die Antikörper CREB-1, ATF-1, CREM-1 und ATF-3 erkennen die Kernproteine nicht und binden nicht an die Oligonukleotid-Kernprotein Komplexe. Es kommt zu keiner Veränderung des Bandenmusters.

In der vierten Spur sieht man das Ergebnis des Experiments nach Inkubation des Oligonukleotid-Kernprotein Komplexes mit dem Antikörper ATF-2. Der Antikörper ATF-2 bindet an den Komplex und verschiebt so den sonst weiter unten zu sehenden Komplex (offener Pfeil) nach oben (geschlossener Pfeil). Bei dem Transkriptionsfaktor, der an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) bindet, handelt es sich um ATF-2, da der Antikörper ATF-2 sc-6233X für das Protein ATF-2 spezifisch ist und nur dieses erkennt.

In der sechsten und vorletzten Spur sieht man das Ergebnis nach Inkubation des CREB (Literatur) Oligonukleotids mit dem Kernextrakt und in der siebten und letzten Spur das Ergebnis nach Inkubation desselben Oligonukleotids mit dem Kernextrakt und dem Antikörper ATF-2. Während der Unterschied in den Bandenmustern zwischen der ersten Spur CREB (H-REV107-1) und der sechsten Spur CREB (Literatur) nochmals deutlich macht, dass hier verschiedene Kernproteine an das jeweilige Oligonukleotid binden, führt die Zugabe des Antikörpers ATF-2 in der siebten Spur auch zu keinem „Supershift“.

Bei der Bindungsstelle CREB (H-REV107-1) handelt es sich also nicht, wie von der Analysesoftware MatInspector vorgeschlagen, um eine CREB Bindungsstelle, sondern um eine ATF-2 Bindungsstelle.

Auch wenn die Verwendung der Kernextrakte aus unbehandelten bzw. behandelten Zellen zu keinem unterschiedlichen Bandenmuster führen, so ist das Signal des "Supershifts" in der Abbildung b) sehr viel stärker als in der Abbildung a). Außerdem zeigt Abbildung 53, dass die Behandlung mit cAMP zu einer Verstärkung des Signals der oberen der drei Banden führt. Diese Bande entspricht der Bindung des Proteins ATF-2 an das Oligonukleotid, da diese Bande durch die Bindung des Antikörpers ATF-2 und dem damit einhergehenden „Supershift“ nach oben verschoben wird. Möglicherweise führt die Behandlung der Zellen mit cAMP zu einer verstärkten Bindung von ATF-2 an die Promotersequenz. Dies ist auch eine Erklärung für die Erhöhung der Aktivität des Promoterkonstrukts A-3 um 30% nach Behandlung der Zellen mit cAMP (Abb. 39).

Des weiteren fällt auf, dass durch die Mutation der für die Bindung des Transkriptionsfaktors wichtigen Basen zwei Banden verschwinden. Allerdings beruht nur die obere der Banden auf die Bindung des Transkriptionsfaktors ATF-2 an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1). Es ist unklar, welches weitere Kernprotein an das Oligonukleotid bindet und so für die untere der Banden verantwortlich ist. Da die hier eingeführte Mutation aber der im Reporter Assay verwendeten Mutation entspricht, ist der dort gesehene Effekt des Aktivitätsverlustes des Promoters möglicherweise auch auf die fehlende Bindung dieses zweiten Proteins zurückzuführen. Dazu müsste es sich aber bei diesem zweiten Kernprotein um einen aktivierenden Transkriptionsfaktor handeln. Falls es sich um einen solchen Transkriptionsfaktor handelt, bleibt offen, zu welchem Anteil ATF-2 und zu welchem Anteil das unbekannte Kernprotein für die aktivierenden Eigenschaften verantwortlich ist.

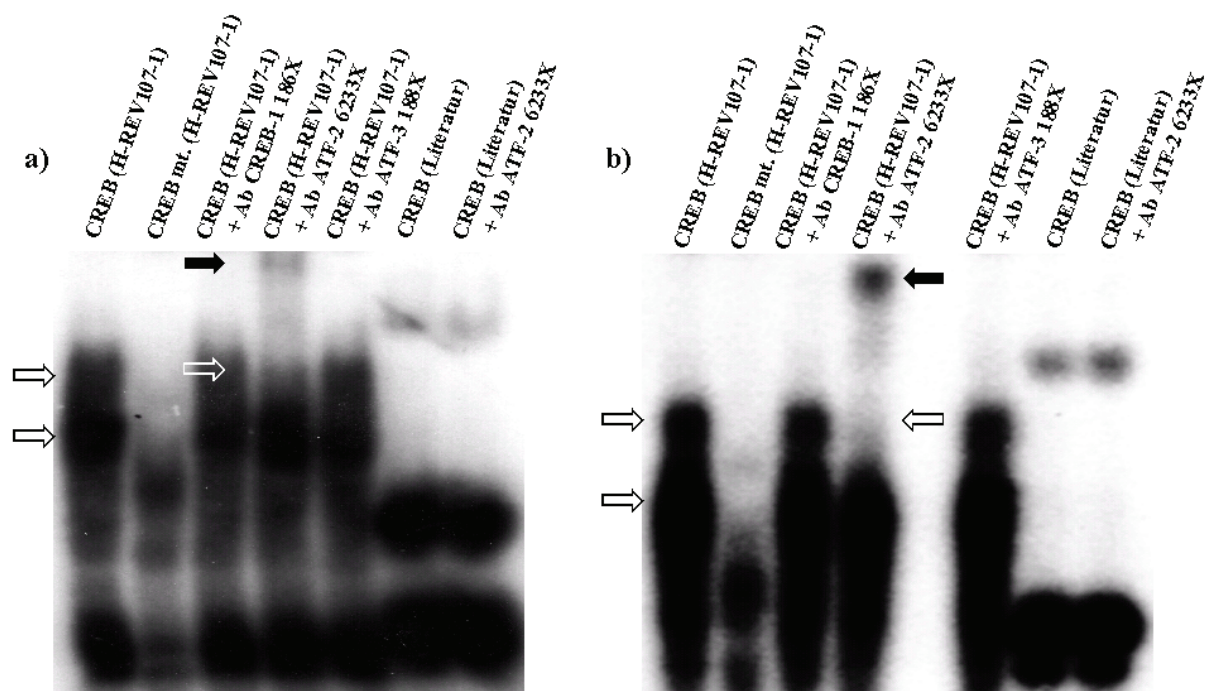


Abbildung 53: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 10 µg Kernproteine a)unbehandelter bzw. b) cAMP behandelter NIH3T3 Zellen (Endkonzentration: 200 µmol) auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. Die jeweils ersten offenen Pfeile zeigen auf die Signale, die durch den Einsatz des mutierten Oligonukleotids CREB mt (H-REV107-1) nicht mehr vorhanden sind. Der geschlossene Pfeil zeigt auf den „Supershift“, der auf der Bindung des ATF-2 spezifischen Antikörper an den Oligonukleotid-Kernprotein Komplex beruht. Der unterhalb des geschlossenen Pfeils liegende offene Pfeil zeigt auf die Stelle, an der sich zuvor die Bande des Oligonukleotid-Kernprotein Komplex (ohne dem gebundenen Antikörper) befand.

Nachdem die Bindung des Transkriptionsfaktors ATF-2 an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) mit Kernproteinextrakt der Zelllinie NIH3T3 gezeigt worden ist, werden jetzt auch weitere Zelllinien im Electrophoretic Mobility Shift Assay untersucht. Hierzu wird das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) mit den Kernextrakten der unbehandelten Zelllinien SKOV-3, A27/80 und OVCAR-3 sowie der schon gezeigten Zelllinie NIH3T3 mit oder ohne ATF-2 Antikörper inkubiert (Abb. 54). In allen Zelllinien kommt es zu einem Supershift, wenn auch bei weitem nicht so deutlich wie im Falle des NIH3T3 Kernextrakts.

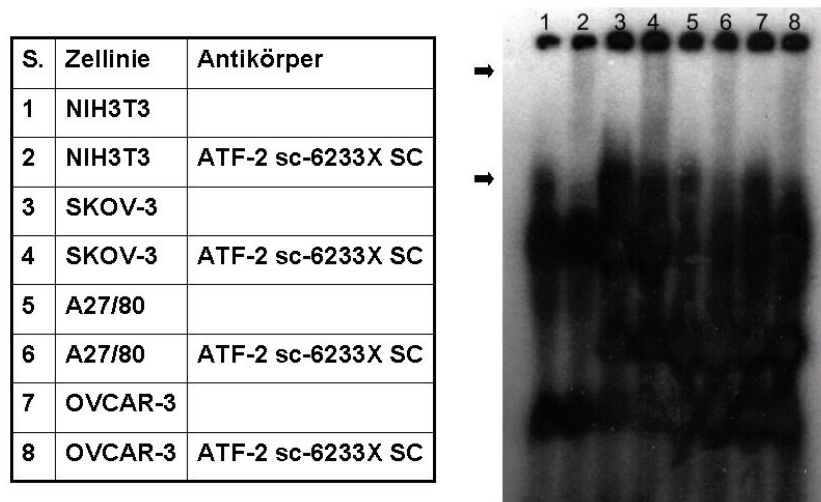


Abbildung 54: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 5 µg Kernproteine unbehandelter Zellen auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. Die Pfeile zeigen auf „Supershifts“, die auf die Bindung des ATF-2 Antikörpers an die Oligonukleotid-Kernprotein Komplexe beruhen.

Auch die Wiederholung des Experiments, jetzt mit dem Kernextrakt cAMP behandelter Zellen, zeigt erneut den zuvor gesehenen „Supershift“.

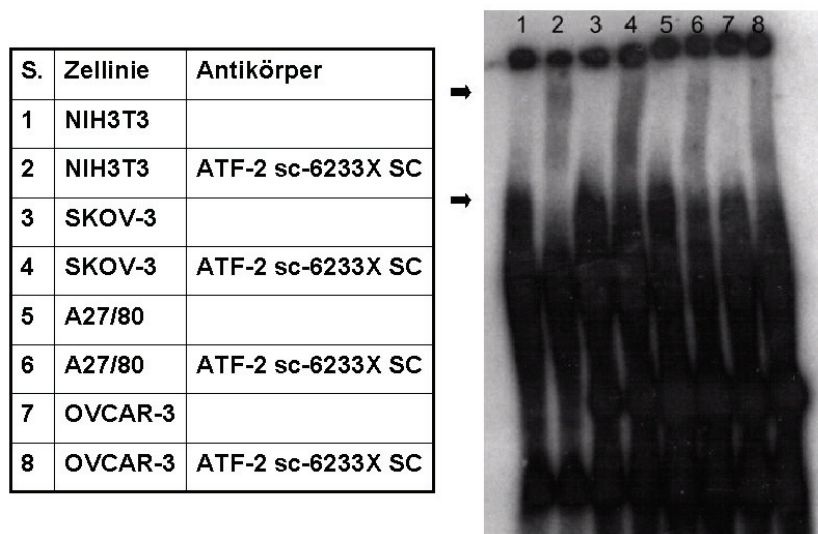


Abbildung 55: Electrophoretic Mobility Shift Assay. In jeder Spur werden 5 µg Kernproteine cAMP behandelter Zellen auf ein 4% Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind nur die spezifischen Banden, die weiter unterhalb der Banden laufende Front ungebundener Oligonukleotide ist abgeschnitten. Die Pfeile zeigen auf „Supershifts“, die auf die Bindung des ATF-2 Antikörpers an die Oligonukleotid-Kernprotein Komplexe beruhen.

Aus den Ergebnissen der Electrophoretic Mobility Shift Assays folgt für die Bindungsstelle cRel (H-REV107-1):

- 1) An das Oligonukleotid cRel (H-REV107-1) binden Kernproteine.
- 2) Die hier bindenden Kernproteine sind nicht identisch mit den Kernproteinen, die an die Oligonukleotide NFκB (Literatur), STATα (Literatur), STAT 1+3 (Literatur) oder STAT 1+5 (Literatur) binden. Dies zeigen die unterschiedlichen Bandenmuster sowie die nicht stattfindende Verdrängung der cRel (H-REV107-1) Oligonukleotid-Kernprotein-Bindung bei der Verwendung der zuvor genannten Oligonukleotide als Kompetitoren.
- 3) Bei dem Kernprotein, das das cRel (H-REV107-1) Oligonukleotid bindet, handelt es sich nicht um p50, p52, RelA (p65) oder cRel, da die gegen diese Proteine gerichteten Antikörper zusammen mit dem Oligonukleotid cRel (H-REV107-1) zu keinem „Supershift“ führen. Dass diese Antikörper für eine Verwendung in einem EMSA zu gebrauchen sind, zeigt der „Supershift“ der Antikörper mit den NFκB (Literatur) Oligonukleotid-Kernprotein Komplexen. Der Antikörper RelB führt auch mit dem NFκB (Literatur) Oligonukleotid zu keinem Supershift. Dies kann daran liegen, dass das Kernprotein RelB nicht an dieses Oligonukleotid bindet, oder dass der Antikörper für diese Art der Experimente nicht zu gebrauchen ist.

Aus den Ergebnissen der Electrophoretic Mobility Shift Assays folgt für die Bindungsstelle CREB (H-REV107-1):

- 1) An das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) binden Kernproteine.
- 2) Die hier bindenden Kernproteine sind nicht identisch mit den Kernproteinen, die an das Oligonukleotid CREB (Literatur) binden. Dies zeigen die unterschiedlichen Bandenmuster sowie die nicht stattfindende Verdrängung der CREB (H-REV107-1) Oligonukleotid-Kernprotein-Bindung bei der Verwendung von CREB (Literatur) als Kompetitor. Auch der umgekehrte Ansatz mit CREB (Literatur) als markiertes Oligonukleotid und CREB (H-REV107-1) als Kompetitor führt nicht zu einer Verdrängung des vorhandenen Komplexes.
- 3) Die schon zuvor im Reporter Assay, innerhalb der potentiellen CREB-Bindungsstelle, eingesetzten Mutationen führt zum Verlust zweier Banden. Die Verwendung des mutierten Oligonukleotids als Kompetitor führt nicht zur Verdrängung des Oligonukleotids CREB (H-REV107-1) aus seinem Komplex. Dies bedeutet, dass die eingeführten Mutationen spezifisch für die Bindung an die CREB (H-REV107-1)-Bindungsstelle sind. Das Verschwinden zweier Banden lässt darauf schließen, dass zwei verschiedene Kernproteine auf Grund der eingebrachten Mutationen, nicht mehr an das Oligonukleotid binden können. In wie weit jedes einzelne dieser Kernproteine zu dem im Reporter Assay beobachteten Aktivitätsverlust des Promoters von 63% beiträgt, kann nicht gesagt werden.
- 4) Bei dem größeren dieser beiden Kernproteine handelt es sich um den Transkriptionsfaktor ATF-2. Dies zeigt der beobachtete „Supershift“ nach Zugabe des gegen das Protein ATF-2 gerichteten Antikörpers. Damit ist gezeigt, dass ATF-2 an das CREB (H-REV107-1) Oligonukleotid bindet. Das zweite, kleinere Kernprotein kann mit den eingesetzten Antikörpern nicht identifiziert werden. Da für das CREB (Literatur) Oligonukleotid die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB-1 beschrieben ist, aber dieses Oligonukleotid als Kompetitor keinen Einfluss auf den CREB (H-REV107-1) Oligonukleotid-Kernprotein Komplex hat, bindet der Transkriptionsfaktor CREB-1 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an das CREB(H-REV107-1) Oligonukleotid
- 5) Der Antikörper CREB-1 hat zusammen mit dem Oligonukleotid CREB (Literatur) keinen "Supershift" ergeben. Anscheinend funktioniert der Antikörper nicht in einem EMSA. Da dieser Antikörper auch die Transkriptionsfaktoren ATF-1 und CREM-1 erkennt, kann über eine mögliche Bindung dieser Mitglieder der CREB Proteinfamilie an das Oligonukleotid CREB (H-REV107-1) keine Aussage gemacht werden. Ob der Antikörper ATF-3 in einem EMSA nicht einsetzbar ist, oder ob dieser Transkriptionsfaktor an keines der beiden Oligonukleotide bindet, kann nicht gesagt werden.

3.9 Abschließende *in silico* Analyse des H-REV107-1

Promoters

Zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit, stehen in den Datenbanken neue, bisher nicht veröffentlichte, Sequenzen zur Verfügung. Um offene Fragen zu klären, werden diese, zum Beginn der Arbeit noch nicht bekannten, DNA-Bereiche 5' und 3' des im Reporterassay untersuchten H-REV107-1 Promoters analysiert. Dabei werden die Sequenzen auf das Vorhandensein von Bindungsstellen hin untersucht, die durch IFN- γ -, TNF- α - oder cAMP-induzierbare Transkriptionsfaktoren gebunden werden können. Ebenso werden die jetzt zur Verfügung stehenden Promotoren der Spezies Mensch, Maus und Ratte miteinander verglichen.

3.9.1 Der DNA-Bereich 5' der untersuchten Promotersequenz

Ein Ergebnis, dessen Daten nicht in einen vollständigen Zusammenhang gebracht werden konnten, ist die Regulation des humanen *H-REV107-1* Gens durch IFN- γ . Während endogenes *H-REV107-1* durch IFN- γ positiv reguliert wird, kann dies mit Hilfe der Promoterkonstrukte nicht gezeigt werden.

Die H-REV107-1 Promoter-DNA, die mit Hilfe der PCR amplifiziert wurde, konnte auf Grund des 419 Basenpaaren langen, 77% TA-haltigen Sequenzbereichs nur bis zum Basenpaar -996 amplifiziert werden. Das bedeutet, dass mögliche Einflüsse auf den Promoter, die von weiter entfernt liegenden Enhancern, Silencern oder Boundarie-Elementen ausgehen, nicht untersucht wurden. Piskurich *et al.* haben ein IFN- γ induzierbares Element beschrieben, das 4 kB 5' des zugehörigen Promoters liegt (Piskurich et al., 1998). Auf dem verwendeten Gesamtpromoter-Konstrukt befinden sich nur zwei potentielle Bindungsstellen, die durch den STAT-1 bzw. den IRF-1 Signalweg reguliert werden können.

Die neu zur Verfügung stehende Sequenz wird mit dem Programm MatInspector bis zum Basenpaar -7300 (Transkriptionsstartpunkt = +1) auf folgende potentiellen Bindungsstellen hin untersucht. Mitglieder der CREB-Familie inkl. ATF-2

Mitglieder der IRF-Familie

Mitglieder der STAT-Familie

Mitglieder der NF κ B Familie

Tabelle 31: Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Bereich –1000 bp bis – 7300 bp

Familie	Mitglied	Sequenzbereich
NFκB	NFκB p65	-6418 bis -6409
	NFκB p65	-5908 bis -5899
	NFκB p65	-3935 bis -3927
	NFκB p65	-3698 bis -3689
IRF	IRF-2	-7159 bis -7150
	IRF-2	-6368 bis -6357
	IRF-3	- 4420 bis -4411
	ISRE	-3939 bis -3929
	IRF-1	-1638 bis -1630
STAT	STAT	-7189 bis -7181
	STAT	-5646 bis -5639
	STAT5	-5270 bis -5262
	STAT	-5057 bis -5049
	STAT-3	-2381 bis -2369
	STAT-5	-2361 bis -2353
	STAT-1	-1749 bis -1741

Für die Mitglieder der CREB-Familie existiert keine weitere potentielle Bindungsstelle. Dies unterstreicht die Bedeutung der bereits nachgewiesenen ATF-2 Bindungsstelle für die *H-REV107-1* Regulation. Es existieren aber vier weitere NFκB-Bindungsstellen, die für eine NFκB-abhängige Aktivierung der *H-REV107-1* Genexpression verantwortlich sein könnten. Die IFN-γ abhängige *H-REV107-1* Expression könnte über eine oder mehrere der sieben potentiellen STAT-Bindungsstellen bzw. eine oder mehrere der fünf IRF-Bindungsstellen reguliert werden

Besonders erwähnenswert ist die IRF-1 Bindungsstelle. Diese befindet sich im Bereich –1638 bp bis -1630 bp und damit nur 640 Basenpaare 5' der bereits untersuchten, *in vitro* offenbar nicht aktiven IRF-1/IRF-2/ISRE Bindungsstelle.

3.9.2 Der DNA-Bereich 3' des Transkriptionsstartpunkts

Für einige Gene ist gezeigt, dass auch Sequenzbereiche 3' des Transkriptionsstartpunkts für die Regulation eines Gens von Bedeutung sein können. Dass sich auch in diesem Bereich regulatorisch aktive Bindungsstellen befinden können, beschreibt die Arbeit von Takaoka *et al.* Diese zeigt, dass für die Regulation des β_4 -Integrin Gens eine Enhancer-Region innerhalb des 1. Introns im Bereich +1905 bp bis +2933 bp von Bedeutung ist. Welche Bindungsstelle hier die entscheidende ist, wurde nicht untersucht (Takaoka et al., 1998). Ob *H-REV107-1* von einer 3' liegenden Enhancer-Region reguliert wird, ist nicht gezeigt. Um die fehlende Aktivierung des Promoterkonstrukts durch IFN- γ zu erklären, wird hier die Sequenz des 1. Exons und ein Teil des 1. Introns auf das Vorhandensein von IFN- γ abhängigen Bindungsmotiven hin untersucht. Hierfür wurde ein 5000 bp großer Sequenzabschnitt analysiert.

Es existieren eine ganze Reihe von potentiell aktiven Bindungsstellen (Tab. 32). Ob eine von diesen einen Einfluss auf die Regulation des *H-REV107-1* Gens besitzt ist nicht untersucht. Es besteht aber die Möglichkeit, dass Elemente, die sich 5' oder 3' von der im Promoterassay untersuchten Sequenz befinden, einen Einfluss auf die IFN- γ abhängige Regulation des *H-REV107-1* Gens besitzen.

Tabelle 32: IFN- γ abhängige, potentielle Bindungsstellen 3' des *H-REV107-1* Transkriptionsstart-punkts

Bindungsstelle	Position
ISRE	+321 bis +339
STAT-3	+324 bis +342
IRF-1	+1647 bis +1665
IRF-7	+1920 bis +1938
IRF-1	+2302 bis +2320
IRF-7	+2865 bis +2883
STAT-1	+2891 bis +2909
IRF-2	+3590 bis +3608
STAT-6	+3650 bis +3668
ISRE	+3659 bis +3677
IRF-1	+3672 bis +3690
STAT-1/STAT-3	+4621 bis +4639
IRF-2	+4736 bis +4754

IRF-2	+4898 bis +4916
STAT-6	+4963 bis +4981

3.9.3 Unterschiede der H-REV107-1 Promotoren von Ratte, Maus und Mensch

H-rev107-1 wurde in Ratten Zelllinien primär als Zielgen des *Ras*-Onkogens und später als ein durch den Mek/ERK-Signalweg supprimiertes Gen identifiziert. Diese Beobachtungen konnten in den humanen Zellen weder in den Expressions-Analysen noch an Hand der Promoterstudien reproduziert werden. Um die unterschiedlichen Ergebnisse aus humanen und Ratten Zellen besser zu verstehen, werden die Promotersequenzen der homologen *H-REV107-1* Gene aus Mensch, Maus und Ratte verglichen. Dazu werden die Regionen 2000 bp 5' des jeweiligen Transkriptionsstartpunkts untersucht. Während zum Maus Promoter bereits Daten publiziert sind (Roder et al., 2002), sind zum Promoter der Ratte noch keine Daten veröffentlicht. Damit die drei Promotoren untereinander vergleichbar sind, beziehen sich die Sequenzangaben auf den Transkriptionsstartpunkt. Dieser wird gleich +1 gesetzt. Das ist besonders für die folgende Beschreibung der Positionen der potentiellen Bindungsstellen wichtig.

Der Vergleich der Sequenzen zeigt eine Homologie von 80% zwischen dem Promoter der Maus und der Ratte. Dieser Bereich erstreckt sich im Promoter der Maus vom Basenpaar +183 bis zum Basenpaar -1426. Im Ratten-Promoter ist dieser Bereich von einem 378 bp langem DNA-Bereich ohne Homologie zur Maus unterbrochen. Die Homologie zum Maus Promoter erstreckt sich vom Basenpaar +198 bis zum Basenpaar -696 und vom Basenpaar -1076 bis zum Basenpaar -1884. Der Promoter des Menschen zeigt keine Homologie mit den Promoterbereichen der beiden anderen Spezies. Ein weiterer Unterschied zwischen den Promotoren aus Ratte und Maus und dem Promoter des Menschen ist das Vorhandensein eines TATA-Box ähnlichen Elements in Maus und Ratte. Dieses Element befindet sich in beiden Promotoren an der Position -43 bp bis -39 bp. Im menschlichen Promoter findet man an ähnlicher Position die funktionelle ATF-2 Bindungsstelle (-33 bp bis -22 bp).

Eine Untersuchung der drei Sequenzen mit dem Programm MatInspector auf das Vorhandensein potentieller Motive der Transkriptionsfaktoren Familien IRF, STAT, NFκB und CREB ergibt eine unterschiedliche Verteilung möglicher Bindungsstellen.

Tabelle 33: Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Maus Promoter

Familie	Mitglied	Bereich
CREB	CREBP-1	-1703 bis -1683
IRF	IRF-1	-1611 bis -1593
	IRF-3	-1576 bis -1558
	IRF-1	-1355 bis -1337

	IRF-7	-1241 bis -1223
	IRF-7	-1225 bis -1207
NFκB	NFκB	-1576 bis -1562

Tabelle 34: Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen im humanen Promoter

Familie	Mitglied	Bereich
CREB	ATF-2	-22 bis -33
IRF	IRF-1	-1210 bis -1202
	IRF-1	-561 bis -549
STAT	STAT-1	-1321 bis -1313

Tabelle 35: Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Ratten Promoter

Familie	Mitglied	Bereich
IRF	IRF-3	-1870 bis -1852
	IRF-1	-1814 bis -1796
	IRF-7	-1683 bis -1665
	IRF-7	-972 bis -954
STAT	STAT-5	-1721 bis -1703
	STAT-3	-872 bis -854
	STAT-1	-582 bis -564
NFκB	NFκB/cRel	-912 bis -898
	NFκB p50	-834 bis -820
	NFκB/cRel	-804 bis -790

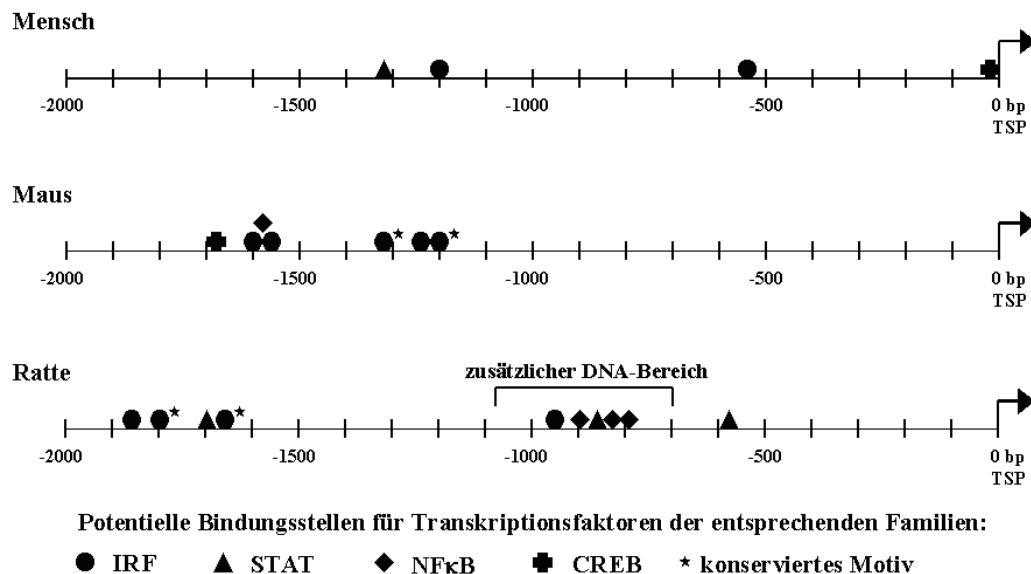


Abbildung 56: Schematischer Vergleich der Promotoren des Menschen-, Maus- und Ratten *H-REV107-1* Gens.

Der humane H-REV107-1 Promoter besitzt die wenigsten der gesuchten Elemente (ein ATF-2, zwei IRF-1 und ein STAT-1 Element). Diese sind relativ gleichmäßig über den Promoter verteilt. Trotz der Sequenzhomologie zwischen dem Maus und dem Ratten Promoter ist besonders auffallend, dass keine große Ähnlichkeit hinsichtlich der untersuchten Bindungsmotive herrscht. Abgesehen von dem TATA-Box-ähnlichen Element (Ratte und Maus: -43 bp bis -39 bp) sind nur die Motive IRF-7 (Ratte: -1683 bp bis -1665 bp; Maus: -1225 bp bis -1207 bp) und IRF-1 (Ratte: -1814 bp bis -1796 bp; Maus: -1355 bp bis -1337 bp) konserviert.

Der Promoter der Ratte besitzt die meisten der untersuchten Motive. Diese kommen in zwei Sequenzbereichen gehäuft vor. Im zusätzlichen, 378 bp langem Sequenzbereich -697 bp bis -1075 bp befinden sich drei NFκB, ein STAT und ein IRF-7 Motiv, wobei die drei NFκB Bindungsstellen in einem Cluster nahe beieinander liegen. Ein weiteres STAT-Element befindet sich an der Position -564 bp bis -582 bp. Damit liegt es zwar im Bereich der Homologie zum Maus Promoter, ist in diesem aber nicht vorhanden. Im Bereich zwischen den Basenpaaren -1665 bis -1870 liegen drei Bindungsmotive der IRF-Familie sowie eine STAT-Bindungsstelle, dicht beieinander. Der Promoter der Ratte besitzt somit möglicherweise eine IFN-abhängige und eine, im Vergleich zum Maus Promoter zusätzliche, NFκB-abhängige, regulatorische Region. Der Maus Promoter besitzt auffallend viele Bindungsstellen für Mitglieder der IRF-Familie (fünf, außerdem ein NFκB- und ein CREB-Motiv) die alle im Bereich zwischen den Basenpaaren -1207 und -1703 liegen. Die Experimente in der Maus-Zelllinie KA-1 zeigen eine direkte und starke Abhängigkeit der *H-rev107-1* Expression von *Irf-1*. Diese Regulation verläuft wahrscheinlich über eine oder mehrere dieser Bindungsstellen. Im humanen Promoter fehlt diese Häufung von IRF-Bindungsstellen. Von den zwei vorhandenen IRF-1 Motiven war nur eine IRF-1 Bindungsstelle in der Sequenz des Gesamt-Promoterkonstrukts enthalten. Möglicherweise war die IFN-γ vermittelte Regulation des humanen H-REV107-1 Promoters mit der einzelnen IRF-1 Bindungsstelle in den Promoter Experimenten nicht nachzuweisen.

4 Diskussion

Tumorsuppressor Gene sind die funktionellen Gegenspieler der Onkogene. Während aktivierte Onkogene für die maligne Transformation einer Zelle verantwortlich sind, unterbinden Tumorsuppressor Gene das unkontrollierte Wachstum. Die Tumorsuppressor Gene werden dabei in zwei Klassen unterteilt. Die Klasse I Tumorsuppressor Gene sind auf Grund dauerhafter Beschädigung ihrer Struktur in ihrer Funktion gehemmt. Dagegen ist die Hemmung der Klasse II Tumorsuppressor Gene reversibel. Ein Beispiel für den reversiblen Verlust einer Genaktivität ist das Fehlen eines für die Expression entscheidenden Transkriptionsfaktors. Ist der Transkriptionsfaktor wieder vorhanden, kann das Tumorsuppressor Gen transkribiert werden. Auf Grund solcher und anderer reversibler Mechanismen sind Klasse II Tumorsuppressor Gene aus medizinischer Sicht von großem Interesse für die Tumorbekämpfung. Bei diesen Genen können durch Aktivierung der Genexpression die Tumorsupprimierenden Mechanismen der Zelle wieder hergestellt werden. Das Gen *H-REV107-1* ist ein Klasse II Tumorsuppressor Gen. Damit ist es potentiell in einem therapeutischen Ansatz von Bedeutung. Um jedoch die Funktion von *H-REV107-1* gezielt wieder herstellen zu können, müssen zuerst die Mechanismen der Expressionshemmung bekannt sein. Hierfür bedarf es eines grundlegenden Verständnisses der *H-REV107-1* Regulation. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der *H-REV107-1* Genexpression in verschiedenen malignen und nicht malignen Zelllinien, sowie die Analyse des *H-REV107-1* Promoters. Dabei gilt der Schwerpunkt der Untersuchung Ovarialkarzinomzelllinien, da in diesem Tumortyp bereits ein Verlust der *H-REV107-1* Expression *in situ* gezeigt wurde. Ergänzend wird die *H-REV107-1* Expression auch in Tumorzelllinien anderen Ursprungs analysiert.

4.1 Bindungsstellen-unabhängige Promoterstudien

4.1.1 Der Core-Promoter des humanen *H-REV107-1* Gens

Das allgemeine Bild, das heute von der Regulation der Genexpression durch einen Promoter gezeichnet wird, sieht folgendermaßen aus: Auf Grund der Zusammensetzung der im Core-Promoter vorhandenen Elemente, binden die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID; TFIIE, TFIIIF und TFIIH. Für viele der basalen Transkriptionsfaktoren sind mehrere Untereinheiten beschrieben. So besteht der Faktor TFIID aus dem TATA-Box Binding Protein und dreizehn weiteren Untereinheiten, den TBP assoziierten Faktoren (TAFs). Diese werden als TAF_{II}250, TAF_{II}70 etc. bezeichnet. Diese unterschiedlichen Faktoren bilden gemeinsam mit der RNA Polymerase II den RNA Polymerase II Transkriptionskomplex. Dieser, für verschiedene Core-Promotoren unterschiedlich zusammengesetzte Komplex, interagiert mit den Transkriptionsfaktoren, die an die Bindungsstellen des proximalen Promoters binden (Smale, 2001). Durch diese Interaktion stabilisieren die Transkriptionsfaktoren den RNA Polymerase II Komplex und erhöhen die Transkriptionsrate. Dies bedeutet, dass Transkriptionsfaktoren die den proximalen Promoter binden, nur dann für die Regulation der Genexpression verantwortlich sind, wenn sie mit dem basalen Transkriptionskomplex interagieren können. Enthält dieser Untereinheiten, die mit dem betreffenden Transkriptionsfaktor nicht interagieren, so besitzt dieser bei der Regulation des Gens keine Funktion. Bei der Induktion einer effizienten Transkription kommt es auf das Zusammenspiel zwischen dem RNA Polymerase II Komplex und den Faktoren, die an den proximalen Promoter gebunden sind, an.

4.1.2 Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts

Um die Frage des Transkriptionsstartpunktes zu beantworten, wurde der H-REV107-1 Promoter mit verschiedenen Methoden untersucht. Mit Hilfe der Primer Extension wurde versucht, den Transkriptionsstartpunkt zu bestätigen bzw. zusätzliche Transkriptionsstartpunkte zu finden. Weiterhin wurde der Transkriptionsstartpunkt mit Hilfe der Datenbank DBTSS bestimmt. Die aus der Primer Extension und DBTSS Analyse erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Startpunkten der vier ursprünglichen klonierten cDNA-Klone (12-1, 9-1, 8-1 und 3-1) verglichen (Husmann et al, 1998). Dabei zeigte sich, dass der Startpunkt des längsten cDNA Klons 12-1 nur 14 Basen 3' des maximalen Startpunkts der Datenbank DBTSS lag.

Die Ergebnisse der Promoterassays scheinen den DBTSS Startpunkt zu bestätigen. So geht beim Deletionsschritt vom Konstrukt E-3 zu F-3 nur der DBTSS Transkriptionsstartpunkt verloren, nicht der Startpunkt 12-1. Die Aktivität der Promoterkonstrukte verringert sich aber von 72% (E-3) auf 1% (F-3) der Gesamtaktivität. Mit der Sequenzverkürzung von E-3 nach F-3 geht allerdings neben dem Startpunkt DBTSS auch die Bindungsstelle ATF-2 verloren. Da ATF-2 eine aktive Bindungsstelle ist, kann der Verlust der Promoteraktivität des Konstrukts F-3 auch mit dem Verlust dieser Bindungsstelle zusammenhängen. Ein weiteres Promoterkonstrukte-Paar, anhand derer Aussagen über die Funktionalität des Transkriptionsstartpunkte getroffen werden können, sind die Konstrukte A-3 und A-2. Während das Gesamt-Promoterkonstrukt A-3 beide Transkriptionsstartpunkte enthält, ist das Konstrukt A-2 vom 3' Ende her verkürzt, so dass der Startpunkt 12-1 entfernt ist. In beiden Konstrukten ist die ATF-2 Bindungsstelle enthalten. Die Entfernung des 3' Endes führt zu keiner Aktivitätsabnahme des Konstrukts A-2. Der entfernte Transkriptionsstartpunkt 12-1 ist also offenbar nicht bedeutend für die Promoteraktivität.

Fasst man diese Ergebnisse mit dem Ergebnis der oligo-capped Datenbank zusammen, dann kann der Startpunkt DBTSS mit großer Wahrscheinlichkeit, als der maximale Transkriptionsstartpunkt angesehen werden. Ob weitere Startpunkte, evtl. zelltypspezifisch vorhanden sind müsste detaillierter untersucht werden.

4.2 Die Signalweg-abhängige Regulation von *H-REV107-1*

4.2.1 Die Suppression der *H-rev107-1* Expression über den MEK/ERK-Signalweg

Das Tumorsuppressorgens *H-rev107-1* wird in der immortalen Zelllinie 208F und in der spontanen Revertante F9 exprimiert, ist aber in der HRAS-transformierten Ratten Fibroblastenzelllinie FE8 supprimiert. Es. Dieser rein korrelative Zusammenhang zwischen der Überexpression von RAS und der Hemmung der *H-rev107-1* Expression, wurde in dieser Arbeit um eine wichtige Komponente erweitert. Es wurde gezeigt, dass es auch in der Ratten Ovarial-Oberflächenepithelzelllinie ROSE199 zu einer Suppression der *H-rev107-1* Genexpression kommt, nachdem diese mit einem KRAS Expressionsplasmid transformiert wurde (ROSE199 A2/5). Durch die Hemmung der Kinase MEK-1 mittels PD98059 erfolgte eine Re-Expression von *H-rev107-1*. Das KRAS vermittelte Signal, welches zur Suppression der *H-rev107-1* Genexpression führt, verläuft über MEK-1.

In der Arbeit von Bonello und Khachigian wurde gezeigt, dass die Expression von *PDGFR-α* durch eine ERK1/2 abhängige Phosphorylierung des Sp-1 Transkriptionsfaktors supprimiert wird. Damit wirkt Sp-1 in diesem Fall als Repressor (Bonello und Khachigian, 2004). Baker *et al.* konnten zeigen, dass Ets-2 durch Interaktion mit Brg-1 und dem SNF/SWI-Ko-Repressor das *BRCA-1* Gen negativ reguliert (Baker et al., 2003).

Da sowohl SP-1 als auch Ets-2 in Abhängigkeit des Mek/Erk-Signalwegs aktiviert werden können, könnten vorhandene, potentielle Ets-2 bzw. Sp-1 Bindungsstellen im Ratten *H-rev107-1* Promoter, die Suppression des Gens durch den aktivierten Ras-Signalweg erklären. In den 2000 Basen 5' des Transkriptionsstartpunkts des Ratten *H-rev107-1* Gens kommen zwei potentielle Sp-1 Bindungsstellen, aber keine Ets-2 Bindungsstelle vor. Die Sp-1 Motive befinden sich in den Bereichen -70bp bis -84bp und -911bp bis -925bp. Das erste Motiv liegt damit in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunkts, das zweite Motiv liegt in dem, im Vergleich zum Maus Promoter, zusätzlichen DNA-Abschnitt. Ob eines dieser Sp-1 Motive einen negativen regulatorischen Einfluss auf die *H-rev107-1* Expression besitzt, ist unbekannt.. Eine weitere Möglichkeit ist die MEK/ERK-vermittelte, indirekte Suppression von *H-rev107-1* (s.u.).

Interessanterweise zeigt auch eine humane Zelllinie dieses H-REV107-1 Regulationsmuster. Die humane Teratokarzinomzelllinie PA-1 besitzt ein aktiviertes NRAS Onkoprotein. Sie zeigt im unbehandelten Zustand ein mittleres *H-REV107-1* Expressionsniveau, das nach Behandlung mit LY294002 keine Änderung aufweist. Eine Behandlung mit PD98059 führt auch hier zu einer Aktivierung der *H-REV107-1* Genexpression. Dies zeigt, dass *H-REV107-1* sowohl in humanen als auch in Ratten Zelllinien durch einen aktivierten MEK/ERK-Signalweg in der Expression supprimiert werden kann. Dies geschieht unabhängig von der RAS-Isoform. Der humane H-REV107-1 Promoter besitzt allerdings keine Ets-2 oder Sp-1 Bindungsstellen.

Neben dem durch MAPK induzierten Expressionsverlust, muss es aber noch weitere Mechanismen geben, die die *H-REV107-1* Genexpression inhibieren, da nur in PA-1 eine Abhängigkeit von *H-REV107-1* vom MEK/ERK-Signalweg nachgewiesen werden konnte.

4.2.2 Die Induktion der *H-REV107-1* Expression über IFN-γ induzierte Signalwege und durch IRF-1

Bereits seit 1995 ist bekannt, dass die *H-rev107-1* Genexpression durch Behandlung von Ratten Astrozytenzellen mit IFN-γ induziert wird (Kuchinke et al., 1995). Auch die Behandlung der Ovarialkarzinomzelllinien A27/80, OVCAR-3 und SKOV-3, der immortalisierten Ratten Ovarialepithelzelllinien ROSE199 und ROSE199A2/5 sowie der Nierenkarzinomzelllinien RCC26 und MZ-1257 mit IFN-γ führt zu einer Aufregulation von *H-REV107-1*.

Das Zytokin IFN- γ reguliert ein weitreichendes Set an unterschiedlichen Genen (Der et al., 1998). IFN- γ wird auf Grund von Virusinfektionen, dsRNA, Wachstumsfaktoren oder anderen Zytokinen induziert und hauptsächlich von Th-1 Lymphozyten und natürlichen Killer-Zellen sezerniert. Es besitzt antiproliferative, antivirale und immunmodulatorische Aktivitäten, zusätzlich kann es auch Apoptose induzieren (Barber, 2000). Saito *et al.* zeigten, dass IFN- γ das Wachstum von Melanom-, Myelom-, Nieren-, Brust- und Ovarialkarzinomzelllinien hemmt (Saito et al., 1986). In Tiermodellen ist IFN- γ eine essentielle Komponente in der Abwehr von transplantierten, humanen Ovarialtumoren (Malik et al., 1991) und verstärkt in malignen Mäusezellen die Suppression des Tumorwachstums durch das Immunsystem (Kaplan et al., 1998). In der Tumorthherapie wurde es in Rahmen von Studien in der Behandlung von Ovarialkarzinomen eingesetzt (Windbichler et al., 2000).

Die Behandlung von Zellen mit IFN- γ kann neben dem JAK/STAT-Signalweg noch weitere Signalwege aktivieren. Unter anderem werden die Kinase Fyn, ein Mitglied der Src-Familie (Uddin et al., 1997), das RAS GTPase-aktivierende Protein 1 (RAP-1), und die MAP Kinasen Pyk2 und ERK1/2 (Takaoka et al., 1999) durch IFN- γ aktiviert (Alsayed et al., 2000). ERK2, kann genauso wie p38, die transaktivierenden Eigenschaften von STAT-1 durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin 727 in der Transkriptions-Aktivierungs-Domäne (TAD) aktivieren.

Der Transkriptionsfaktor IRF-1 ist eines der wichtigsten Zielgene von IFN- γ , da IRF-1 für die Expression vieler, durch IFN- γ induzierter, Gene verantwortlich ist. Die Analyse der *IRF-1* Expression in Ovarialkarzinomzelllinien liefert ein heterogenes Bild. Die immortalisierte, nicht maligne Zelllinie HOSE exprimiert *IRF-1* auf hohem Niveau. OVCAR-3 und SKOV-3 zeigen eine deutlich geringere und die Zelllinien PA-1 und A27/80 nur eine sehr schwache *IRF-1* Expression. Diese Verteilung entspricht, mit Ausnahme der Zelllinie PA-1, dem Expressionsniveau der *H-REV107-1* mRNA in diesen Zellen. In PA-1 ist das *H-REV107-1* Expressionsniveau im Vergleich höher als das *IRF-1* Expressionsniveau. Dies spricht dafür, dass im Falle der Teratokarzinomzelllinie PA-1 die *H-REV107-1* Expression nicht über den STAT-1, sondern über den MEK/ERK-Signalweg, reguliert wird.

Nach Induktion mit IFN- γ erfolgt in den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3 und A27/80 ein deutlicher Anstieg der *IRF-1* mRNA Menge entsprechend der zu beobachtenden Aufregulation der *H-REV107-1* Expression. Das selbe gilt für die Nierenkarzinomzelllinie RCC26, die im unbehandelten Zustand eine schwache *IRF-1* Expression und nach Behandlung mit IFN- γ eine starke *IRF-1* Expression zeigt. Auch hier korreliert die *IRF-1* mit der *H-REV107-1* Expression.

Diese Korrelation zwischen der *H-REV107-1* und der *IRF-1* Genexpression in den humanen Zelllinien deutet einen funktionellen Zusammenhang der Regulation beider Gene an. Dies wird auch durch die zeitabhängige Induktion der beiden Gene in den Zelllinien A27/80 und OVCAR-3 nach Behandlung der Zellen mit IFN- γ gezeigt. Beide Gene werden zeitlich korrelierend exprimiert, wobei die Induktion der *IRF-1* Expression zu Beginn der Zeitreihe stärker einsetzt als die Induktion der *H-REV107-1* Expression. Die Abstände zwischen den gemessenen Zeitpunkten sind aber zu groß, um festzustellen, ob die IRF-1 Expression vor der H-REV107-1 Expression induziert wird.

Durch die Verwendung von NIH3T3 Zellen, die mit einem humanen Östrogen Rezeptor – IRF-1 Fusionsprotein stabil transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass *H-rev107-1* in den Maus Zellen ein direktes Zielgen von IRF-1 ist. Das Experiment wurde sowohl mit, als auch ohne Zugabe von Cycloheximid durchgeführt. In beiden Fällen wurde die *H-rev107-1* Expression stark induziert. Cycloheximid ist ein Proteinsynthese-Inhibitor, d.h. nach Zugabe von Cycloheximid kann transkribierte mRNA nicht mehr zum Protein translatiert werden. Die *H-rev107-1* Expression wird somit unmittelbar durch das aktivierte IRF-1 induziert.

IRF-1 zeigt viele Aktivitäten, vor allem in den Bereichen Wachstumskontrolle, Zellzykluskontrolle, Tumorsuppression und Apoptose. Eine wichtige Funktion des IRF-1 ist seine Eigenschaft als Tumorsuppressor. Durch die Expression von IRF-1 können Onkogen-transformierte Zellen revertiert werden (Tanaka et al., 1994). Ebenso werden IRF-1-defiziente embryonale Maus Fibroblasten durch die alleinige Transfektion mit aktiviertem HRAS transformiert, während Wildtyp-Fibroblasten mindestens mit zwei aktivierten Onkogenen transfiziert werden müssen, um eine Transformation zu erreichen (Tanaka et al., 1994). In Studien ist gezeigt, dass IRF-1 in der Entwicklung von humanen Tumoren eine Rolle spielt. Die Deletion von IRF-1 auf dem Chromosom 5q31.1 ist eine der am Häufigsten beobachteten genetischen Anomalien bei Leukämie bzw. beim präleukemischen Myelodysplastischen Syndrom (Mecucci et al., 1985; Willman et al., 1993). Auch in ösophagealen und gastritischen Tumoren ist der Verlust eines IRF-1 Allels häufig anzutreffen, wobei oftmals das zweite IRF-1 Allel durch Punktmutation inaktiviert ist (Tamura et al., 1996; Nozawa et al., 1998). Ein weiterer Mechanismus der IRF-1 Inaktivierung ist das Exonskipping, bei dem mRNA mit fehlendem Exon 2 bzw. fehlendem Exon 2 und 3 exprimiert wird, was zum Verlust des korrekten AUG Start-Codons führt (Harada et al., 1994). Ein Verlust der IRF-1 Expression in Ovarialtumoren ist bisher aber nicht bekannt.

IRF-1 spielt in NIH3T3 Zellen eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Dabei ist die *IRF-1* Expression in der G1-Phase am höchsten. Nach Serum Stimulation nimmt sie rasch ab und kurz vor und während der DNA Synthese wieder zu (Harada et al., 1993). Primäre Fibroblasten aus IRF-1^{-/-} defizienten Mäusen sind nicht mehr in der Lage, einen, durch DNA Schaden induzierten, Zellzyklus-Stop auszuführen. Die mRNA Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 ist von der Aktivierung durch IRF-1 und p53 abhängig (Tanaka et al., 1996). Dies könnte die Erklärung für den Einfluss des IRF-1 auf den G1-Zellzyklus-Stopp sein.

Möglicherweise ist auch das IRF-1 Zielgen *H-REV107-1* für eine oder mehrere der, von IRF-1 vermittelten, Aktivitäten verantwortlich. In OVCAR-3 führt die Behandlung der Zellen mit IFN- γ zur Aktivierung der *IRF-1* Expression, welches wiederum die *H-REV107-1* Expression aktiviert. Die Expression von *H-REV107-1* in OVCAR-3 führt zur Apoptose der Zellen. Als mögliche Schlussfolgerung resultiert hieraus, dass *H-REV107-1* ein Zielgen von IRF-1 ist, dessen Aktivierung in Ovarialkarzinomen Apoptose vermittelt.

Auf Grund dieser Schlussfolgerung wurde der H-REV107-1 Promoter im Promoter Reporter Assay auf eine Abhängigkeit vom IFN- γ Signalweg untersucht. Neben der Stimulation der endogenen *H-REV107-1* Expression durch IFN- γ lässt sich auch die Promoteraktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 mit IFN- γ um 22% steigern. Bei der *in silico* Analyse des H-REV107-1 Gesamtpromoter-Konstrukts fallen zwei potentielle Zielelemente für den IFN- γ Signalweg bzw. den IRF-1 Transkriptionsfaktor auf. Das eine ist die potentielle IRF-1/IRF-2/ISRE Bindungsstelle zwischen den Basen -989 und -977 am 5' Ende des untersuchten Promoterbereichs. Das andere ist die potentielle STAT-Bindungsstelle -353 und -341 am 3'Ende des untersuchten Promoterbereichs.

Die Mutation des IRF-1/IRF-2/ISRE Elements führt in NIH3T3 Zellen überraschend zu einer Zunahme der Promoteraktivität um 40%. Dies deutet auf eine Repressor-Bindungsstelle hin und entspricht der ebenfalls beobachteten Zunahme der Aktivität nach Deletion dieser Region. Möglicherweise bindet der als Suppressor beschriebene Faktor IRF-2 dieses Element (Harada et al., 1989). IRF-2 besitzt die selbe DNA-Bindungsdomäne wie IRF-1, verfügt aber nicht über dessen Aktivierungsdomäne. Seine Eigenschaft als Repressor führt zu einer autoinhibitorischen Regulation der durch IRF-1 aktivierten Genexpression. Das wurde für die IRF-1 Zielgene *p21* und *2-5A Synthetase* gezeigt (Coccia et al., 1999). Diese Hemmung der aktivierenden Eigenschaften von IRF-1 durch IRF-2 kann auch eine Erklärung für die in Intervallen verlaufende Aktivierung der *H-REV107-1* Genexpression sein, die in der zeitabhängigen Induktion der *H-REV107-1* Expression beobachtet wurde.

Das IRF-2 Expressionsniveau ist im Verlauf des Zellzyklus, in Abwesenheit von IFN- γ , konstant (Harada et al., 1993). IRF-2 wird *in vitro* durch die Kinasen PKA, PKC und Casein KinaseII phosphoryliert. Die MAP Kinasen JNK1, p38 und ERK2 phosphorylieren IRF-2 nicht. In wiefern der Phosphorylierungsstatus die inhibitorische Aktivität von IRF-2 definiert, ist aber nicht untersucht. Für IRF-1 wird bisher nur die Menge des Proteins und nicht der Phosphorylierungsstatus als aktivitätsbestimmender Schritt bezeichnet (Pine et al., 1990). Es bleibt auch unklar, ob IRF-2 auch in nicht IFN- γ stimulierten Zellen an den H-REV107-1 Promoter bindet. Eine konstitutive Bindung an einen Promoter ist für IRF-2 nicht beschrieben.

Das Problem, die direkte Aktivierung des *H-REV107-1* Gens durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 mit Hilfe des Promoterassays nachzuweisen, kann verschiedene Ursachen haben.

Die Promoterassays wurden als transiente Transfektionen durchgeführt. Ein Nachteil der transienten Transfektion ist, dass dem Reporterplasmid die natürliche Umgebung im Chromatin fehlt. Im transienten System kommen die von den Histonen, die in einem aktiven Zustand (Azetyliert und De-Methyliert) oder in einem inaktiven Zustand (De-Azetyliert und Methyliert) vorliegen können, ausgehenden Einflüsse auf den Promoter nicht zu tragen. Außerdem ist die Unzuverlässigkeit möglicher Ko-Transfektionen ein Nachteil.

Als Alternative kann man die Promoterassays als stabile Transfektion durchführen. Ein Problem bei der stabilen Transfektion, bei der die transfizierte DNA in die DNA der Wirtzelle integriert wird, ist jedoch, dass der Ort der Integration nicht vorgegeben werden kann.

Jeder Klon integriert den Promoter an einer anderen Stelle in seine DNA. Der Einfluss von Enhancern und Silencern kann in diesen Fällen weder vorhergesagt noch belegt werden. So kann die positive Regulation des Reportergens eines ausgewählten Klons gar nicht auf den integrierten Promoter selbst, sondern auf dessen Nachbarschaft zu in der Nähe sich befindenden Enhancer-Regionen beruhen.

Auch das Fehlen des sehr T/A-haltigen Sequenzbereichs 5' der IRF-1/IRF-2/ISRE-Bindungsstelle sowie der 5' dieser Region vorhandenen, zweiten IRF-1-Bindungsstelle im untersuchten Promoterkonstrukt, kann ein Grund dafür sein, dass die einzelne IRF-1/IRF-2 Bindungsstelle nicht aktiv ist. Möglicherweise benötigt die untersuchte IRF-1/IRF-2/ISRE Bindungsstelle die Anwesenheit der weiter 5' liegenden Bindungsstelle, so dass diese gemeinsam als Modul funktionieren. Eine andere Möglichkeit ist, dass der zwischen den beiden Bindungsstellen sich befindende, 419 Basenpaare lange Sequenzbereich mit einem AT-Gehalt von 77% eine aktive Bedeutung in der Funktion der, direkt 3' folgenden, IRF-1 Bindungsstelle besitzt. Sollte dieser Sequenzbereich eine Sekundärstruktur ausbilden, könnte zum einen die IRF-1 Bindungsstelle aktiviert werden, zum anderen würden die beiden IRF-1 Bindungsstellen räumlich näher aneinander rücken. Eine Methode, die zu weiteren Ergebnissen führen könnte, ist die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP). Hierbei wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren an einen Promoter *in situ* analysiert, wobei die Chromatin-DNA Struktur nicht gestört wird. Damit könnte nach IFN- γ Zugabe die Bindung von IRF-1 an den H-REV107-1 Promoter analysiert werden.

Das Element ISRE wird von einem heterotrimeren Komplex gebunden, der aus STAT1 α , STAT2 und p48 besteht. Dieser als ISGF3 bezeichnete Komplex wird nach Induktion der Zelle mit den Interferonen TypI, IFN- α bzw. IFN- β , gebildet. Da sich in ersten Experimenten keine Abhängigkeit der *H-REV107-1* Expression von den Interferonen TypI zeigte, wurde der Einfluss dieser Zytokine auf den H-REV107-1 Promoter nicht weiter untersucht.

Die Mutation und Inaktivierung der STAT-Bindungsstelle führt zu keiner veränderten Aktivität des Promoterkonstrukts. Diesem Element kann bisher keine funktionelle Bedeutung zugeordnet werden.

4.2.3 Die Wechselwirkung zwischen den über MEK verlaufenden und den von IFN- γ induzierten Signalwegen

Da die *H-rev107-1* Expression in ROSE199 und ROSE199A2/5 sowohl IFN- γ induzierbar als auch vom MEK/ERK-Signalweg abhängig ist, wurden diese Zelllinien auf mögliche "Cross-Talks", also die Wechselwirkungen zwischen den zwei Signalwegen, hin untersucht. Die Analyse eines möglichen "Cross-Talks" zwischen dem IFN- γ und dem MEK/ERK-Signalweg führt zu einem interessanten Ergebnis. Während in der KRAS-transformierten Zelllinie ROSE199A2/5 nach Induktion mit IFN- γ die *H-rev107-1* Genexpression nur minimal und nach Inkubation mit dem MEK Inhibitor PD98059 die *H--rev107-1* Genexpression auf ein mittleres Niveau angehoben wird, erfolgt bei gleichzeitiger Behandlung der Zelllinie mit IFN- γ und PD98059 eine sehr viel stärkere Induktion der *H-rev107-1* Genexpression.

Die Analyse der *H-REV107-1* Expressionen deuten auf eine Wechselwirkung zwischen dem MEK/ERK- und dem IFN- γ -abhängigen STAT-1-Signalweg hin. Klampfer *et al.* haben gezeigt, dass aktiviertes KRAS die *STAT-1*

und *STAT-2* Genexpression inhibiert. Dies führt zu einer verminderten Expression einer Reihe von IFN- γ induzierbaren Genen. Durch Hemmung der KRAS Aktivität lässt sich die *STAT-1* und *STAT-2* Expression wieder herstellen (Klampfer et al., 2003). Diese Abhängigkeit gibt eine mögliche Erklärung für den beobachteten, synergistischen Effekt auf die *H-REV107-1* Expression nach gleichzeitiger Hemmung des MEK-Signalwegs und Aktivierung des IFN- γ -Signalwegs. Der in der Zelllinie ROSE199A2/5 aktivierte RAS-Signalweg unterdrückt möglicherweise die *STAT-1* Expression. Durch Behandlung der Zelllinie mit PD98059 wird der MEK-Signalweg unterdrückt, *STAT-1* wird wieder exprimiert und kann durch IFN- γ aktiviert werden.

Die Analyse der *Irf-1* Expression zeigt außerdem, dass in ROSE199A2/5 nach Behandlung mit dem MEK Inhibitor PD98059 *Irf-1* wieder exprimiert wird. Aus der Kombination dieser Ergebnisse resultiert für die Ratten Ovarialepithelzellen folgendes Modell (Abb.57):

In ROSE199 wird *H-rev107-1* über Irf-1 gesteuert. Nach Transformation der Zellen durch aktiviertes KRAS wird der Mek/Erk-Signalweg konstitutiv aktiviert und hemmt dadurch Stat-1. Die Hemmung von Stat-1 führt wiederum zu einem Verlust der *Irf-1* Expression (Ohmori et al., 1997; Bottrel et al., 1999). Dadurch wird letztendlich die *H-rev107-1* Expression verhindert. Für dieses Modell sprechen die von Klampfer *et al.* gefundenen Ergebnisse und die Tatsache, dass *Irf-1* ein Zielgen von Stat ist. Zum Nachweis dieses Modells sollte z.B. das Stat-1 Expressionsniveau und der Stat-1 Phosphorylierungsstatus in Abhängigkeit von PD98059 in einem Western Blot Assay überprüft werden.

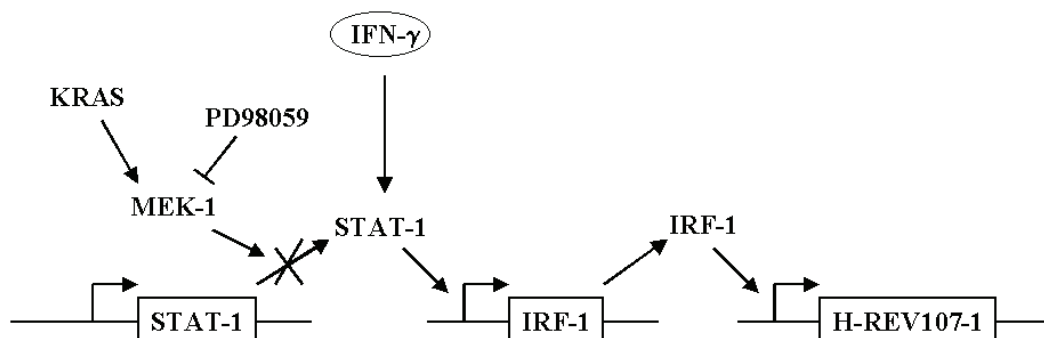


Abbildung 57: Ein möglicher, gemeinsamer Einfluss des MEK-1 und des IFN- γ induzierten Signalwegs auf die *H-REV107-1* Expression

4.2.4 Die Induktion der *H-REV107-1* Expression über den TNF- α induzierten Signalweg

Die Inkubation der Nierenkarzinomzelllinie MZ1257 mit dem Zytokin TNF- α führt zu einer Induktion der endogenen *H-REV107-1* Expression. Auch die Aktivität des Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 wird durch Induktion mit TNF- α deutlich gesteigert.

Bei der Analyse des H-REV107-1 Promoters fallen im Sequenzbereich + 65 bis + 75 zwei potentielle, TNF- α abhängige Bindungsstellen auf. Hierbei handelt es sich um Bindungsstellen für die NF κ B-Untereinheit cRel. Der Transkriptionsfaktor NF κ B wird durch TNF- α aktiviert (Abb.58).

Die Mutation der beiden cRel-Bindungsstellen führt zum höchsten Aktivitätsverlust des Reporterplasmids, wobei die Restaktivität der mutierten cRel #1 Bindungsstelle mit 9% niedriger liegt als die Restaktivität der Bindungsstelle cRel #2 (37%). Die gemeinsame Mutation beider cRel-Bindungsstellen führt zu einer Restaktivität von 7%. Dieser hohe Verlust der Promoteraktivität zeigt eine große, funktionelle Bedeutung dieses Sequenzbereichs.

Weiterhin ist die Aktivität des Gesamtpromoters eindeutig von der Translokation eines oder mehrerer der NF κ B-Familienmitglieder in den Zellkern abhängig. Dies zeigt der Aktivitätsverlust des Reporterplasmids A-3 nach Ko-Transfektion eines Expressionplasmids für den Inhibitor IkappaB- Δ N zeigt. Das Protein IkappaB- Δ N inhibiert vollständig die DNA-Bindungsaktivität aller Proteine der NF κ B-Familie, indem es die Translokation der NF κ B-Familienmitglieder in den Zellkern verhindert (Baeuerle und Baltimore, 1996).

Die Transfektionsrate einer Ko-Transfektion liegt nie bei 100%. Das bedeutet, dass einige Zellen zwar das Konstrukt A-3, aber nicht das Plasmid IkappaB- Δ N aufgenommen haben. Die im Reporter Assay gemessene Aktivität ist die Summe der Aktivitäten der einfach- und der doppelt-transfizierten Zellen. Der Beitrag der nur mit A-3 transfizierten Zellen zur Gesamtaktivität führt dazu, dass „nur“ eine Abnahme der Aktivität von 60% gemessen wird, während die Abnahme der Aktivität im Fall der mutierten Bindungsstelle cRel #1 90% beträgt.

Damit ist aber noch nicht nachgewiesen, dass diese Abhängigkeit über die cRel Bindungsstelle läuft. In den durchgeführten EMSA Experimenten wurden Antikörper verschiedener Firmen eingesetzt, die gegen die NF κ B-Proteine p50, p52, RelA, RelB und cRel gerichtet waren. Es konnte aber keines dieser Proteine als der, an cRel #1 bindenden, Faktor nachgewiesen werden. Da IkappaB- Δ N die Expression aller NF κ B-abhängigen Gene inhibiert, besteht die Möglichkeit, dass *H-REV107-1* indirekt über NF κ B Proteine reguliert wird.

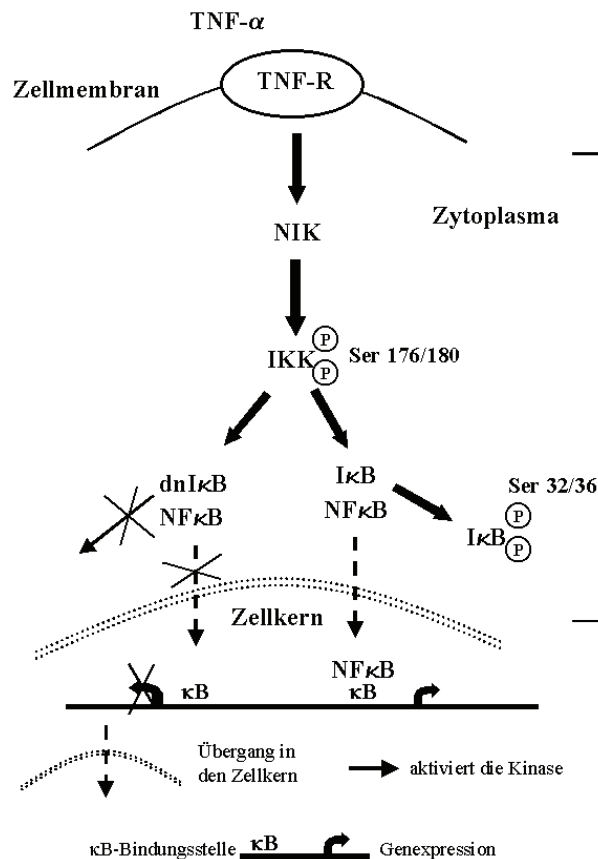


Abbildung 58: Der NFκB-Signalweg führt zur Aktivierung von Zielgenen. Dies wird durch den Repressors dnIκB verhindert. dnIκB bindet NFκB, lässt sich aber, im Gegensatz zum Wildtyp-IκB, nicht durch Phosphorylierung aus dem IκB-NFκB Komplex trennen. NFκB bleibt im Zytosol gebunden und die Transkription der Zielgene wird unterbunden.

Eine alternative Erklärung für die Abnahme der Promoteraktivität nach der Mutation der potentiellen cRel Bindungsstelle beruht auf der Position der Bindungsstelle im 5' untranslatierten Bereich von *H-REV107-1*. Das cRel-Motiv liegt +65 bis +76 Basenpaare 3' des Transkriptionsstartpunktes. In diesem Bereich bindet auch die RNA II Polymerase an den Core Promoter. An die als cRel bezeichnete Sequenz könnte also auch ein noch nicht näher definierter Faktor binden, der zur Transkriptionsmaschinerie der RNA II Polymerase gehört (z.B. eine TAF-Untereinheit). Dies würde erklären, warum im EMSA zwar eine deutliche Proteinbindung nachgewiesen wurde, aber kein Mitglied der NFκB-Familie identifiziert werden konnte.

4.2.5 Die Wechselwirkungen zwischen dem TNF- α und dem IFN- γ induzierten Signalweg

Ein wichtiges Gen, dessen Expression durch NF κ B induziert wird, ist *IRF-1* (Pine, 1997; Mori et al., 1999). Der IRF-1 Promoter besitzt neben einem STAT Element auch eine aktive NF κ B-Bindungssequenz (Tanaka und Taniguchi, 2000). Die Aktivierung der *H-REV107-1* Genexpression durch TNF- α könnte also indirekt über *IRF-1* verlaufen. Die Überexpression von IkappaB- Δ N führt möglicherweise zur Suppression der *IRF-1* Expression und dadurch auch zur Suppression von *H-REV107-1*. Dies erklärt die beobachtete Abhängigkeit der H-REV107-1 Promoteraktivität von TNF- α und NF κ B, ohne dass ein Protein der NF κ B Familie an die vorhandenen cRel-Bindungsstellen bindet.

Eine weitere Verknüpfung zwischen dem NF κ B-Signalweg und den IFN- γ abhängigen Signalwegen bildet die MAP Kinase PKR (Abb.59). Diese wird durch TNF- α und IFN- γ aktiviert und aktiviert selbst NF κ B durch Phosphorylierung. Das aktivierte NF κ B transloziert in den Zellkern. Die ebenfalls von PKR aktivierte Kinase p38 aktiviert innerhalb des Zellkerns die transkriptionelle Aktivität von STAT-1 und NF κ B (Norris und Baldwin, 1999). Aktiviertes NF κ B induziert die *IRF-1* Expression über die NF κ B-Bindungsstelle im IRF-1 Promoter (Kumar et al., 1997; Zhang et al., 1998). IRF-1 induziert die *p38* Genexpression und schafft damit eine positive Rückkopplung.

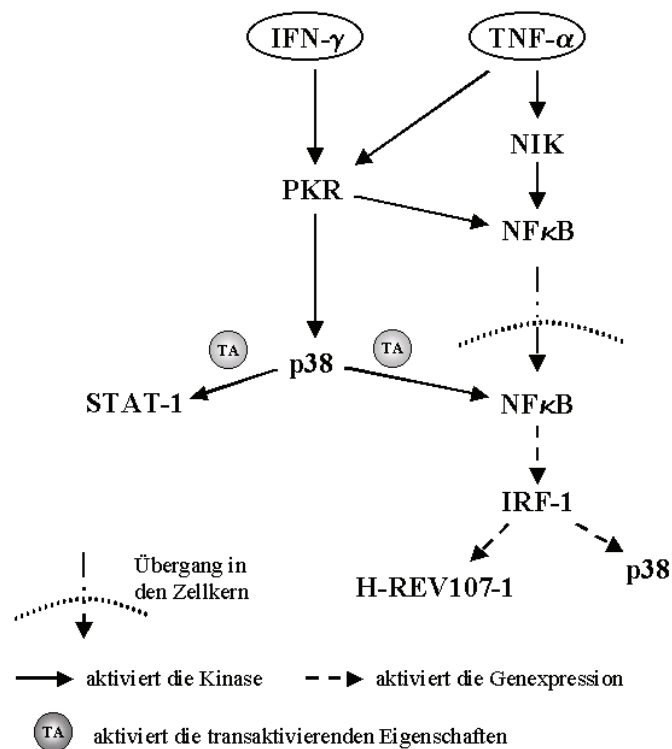


Abbildung 59: Mögliche Wechselwirkungen zwischen dem TNF- α und dem IFN- γ induzierten Signalweg, die zur *H-REV107-1* Expression führen. PKR aktiviert NF κ B, dass in den Zellkern translokalisiert. Dort aktiviert die Kinase p38 die transaktivierenden Eigenschaften von NF κ B.

4.2.6 Die Induktion der *H-REV107-1* Expression durch den cAMP-abhängigen Signalweg und den Faktor ATF-2

Eine *in silico* Analyse des Promoters zeigt eine potentielle CREB-Bindungsstelle -25 bis -30 Basenpaare 5' des Transkriptionsstartpunkts. Die Behandlung der, mit dem Gesamtpromoter-Konstrukt A-3 transfizierten, NIH3T3 Zelllinie mit cAMP führt zu einer um 32% gesteigerten Aktivität des Konstrukts. cAMP aktiviert die Mitglieder der CREB-Familie (Lalli und Sassone-Corsi, 1994).

Die Mutation der CREB-Bindungsstelle verringert hingegen die Aktivität des Promoters um 63%. Dies deutet auf eine wichtige Funktion dieser Bindungsstelle hin.

Im EMSA Assay konnte die Bindung des Faktors ATF-2 eindeutig nachgewiesen werden. Eine Beteiligung der anderen Mitglieder der CREB-Familie, CREB-1, CREM-1, ATF-1 und ATF-3 kann nur für CREB-1, auf Grund des unterschiedlichen Bindungsmusters des in der Literatur beschriebenen CREB-1 Oligonukleotids, ausgeschlossen werden. Die Antikörper gegen CREB-1, CREM-1, ATF-1 und ATF-3 zeigten auch in den, als Positivkontrolle durchgeführten, EMSA Versuchen keinen "Supershift".

Das cyclische AMP Responsive Element (CRE; palindromische Sequenz: TGACGTCA) kommt in vielen Promotoren hoch konserviert vor (Bokar et al., 1988). Innerhalb der CREB Familie werden neben Homo- auch spezifische Heterodimere gebildet. So bildet ATF-3 mit ATF-2, nicht aber mit CREB-1 Heterodimere. (Hai et al., 1989). Neben den eigenen Familienmitgliedern bilden CREB Proteine auch mit den Mitgliedern der Jun/Fos-Familie spezifische Heterodimere, die unterschiedliche Affinitäten zu den CRE bzw. AP-1 Bindungsstellen besitzen. So bilden ATF-2 und ATF-3 nur mit Jun Heterodimere, während ATF-4 mit Jun, Fos und Fra-1 Heterodimere bildet. CREB-1 bildet überhaupt keine interfamiliären Heterodimere. CREM-1 wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht. Der ATF-2/cJun Komplex bindet mit abnehmender Affinität an die CRE (TGACGTCA) > ENK-2 (TGCGTCA) > AP-1 (TGACTCA) Bindungsstellen, während z.B. ATF-3 an die CRE, ENK-2 und AP-1 Bindungsstelle mit der gleichen Affinität bindet (Hai und Curran, 1991). Die Sequenz der Bindungsstelle innerhalb des H-REV107-1 Promoters lautet: TGACCTCA und liegt damit zwischen der CRE Bindungsstelle (Austausch einer Base: G zu C) und der AP-1 Bindungsstelle (Insertion einer Base C). Der Versuch, die Bindung des cJUN-Proteins im EMSA nachzuweisen, führte jedoch zu keinem Ergebnis.

Die Transkriptionsfaktoren-Familie spielt neben der cAMP-vermittelten auch in der Calcium- und Virusinduzierten Transkriptionsregulation eine wichtige Rolle (Roesler et al., 1988). Biologische Funktionen des cAMP-Signalwegs sind bei der hormonellen Antwort, der Differenzierung, der Proliferation (Della Fazio, 1997) und bei kardiologischen Prozessen nachgewiesen (Muller, 2000).

Der Transkriptionsfaktor ATF-2 wird ubiquitär exprimiert, ein besonders hohes mRNA Niveau zeigt sich im Gewebe des Gehirns. Das Protein besitzt ein C-terminales, DNA-bindendes Basic Domain/Leucin Zipper (bZIP) Motiv und eine N-Terminale Trans-Aktivierungsdomäne (TAD). Im nicht aktiven Zustand interagiert die bZIP Domäne intramolekular mit der TAD und inhibiert so die trans-aktivierende Eigenschaft von ATF-2 (Li und Green, 1996).

In der undifferenzierten, polypotenten, embryonalen Krebszelllinie F9 (EC) wird der Faktor UTF-1 als ein aktivierender Ko-Faktor von ATF-2 beschrieben. Dabei dient dieser Faktor zur Demaskierung der Trans-

Aktivierungsdomäne des ATF-2. Interessanterweise interagiert dieser Co-Faktor auch mit TAF_{II}70, einem Bestandteil des TFIID-Komplexes (Fukushima et al., 1998). Es wird angenommen, dass auch in differenzierten Zelllinien noch nicht identifizierte Ko-Faktoren existieren, die ähnlich wie UTF-1 eine Brücke zwischen der Transaktivierenden Domäne des ATF-2 und dem TFIID-Komplex bilden. Die Arbeit von Fukushima *et al.* zeigt einen direkten Zusammenhang zwischen ATF-2 und der RNA Polymerase II. Wird ein ATF-2 Konstrukt eingesetzt, das auf Grund einer deletierten bZIP Domäne konstitutiv aktiv ist, so interagiert die Transaktivierende Domäne des ATF-2 direkt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (Fukushima et al., 1998).

Für das ATF-2 Element wurde gezeigt, dass diese Bindungsstelle gemeinsam mit einem Inr-Element einen funktionsfähigen Promoter darstellt, der ausreicht, um die Gentranskription einzuleiten (Conaway und Conaway, 1991). Ein Core-Promoter kann eine TATA-Box plus einem Initiator (Inr)-Element oder eines der beiden Elemente besitzen. Besitzt ein Promoter ein Inr-Element, so kann sich 3' von diesem, in einem genau definierten Abstand von 28 Basen, ein Downstream Promoter Element (DPE) befinden. Das ATF-2 Element kann die Funktion der TATA-Box innerhalb des Core-Promoters ersetzen. Anstatt des Faktors TBP, der an die TATA-Box bindet, übernimmt der Faktor ATF-2 die Stabilisierung des RNA Polymerase II Komplexes. Dies geschieht durch die Wechselwirkung mit der Untereinheit TAF_{II}70 des basalen Transkriptionsfaktors TAFIID.

Im humanen H-REV107-1 Promoter befindet sich das ATF-2 Element in genau an der Position zum Transkriptionsstartpunkt, an dem sich ansonsten die TATA-Box befindet. Damit ist die räumliche Voraussetzung gegeben, dass ATF-2 durch die Stabilisierung des RNA Polymerase II-Komplexes aktiv zur verstärkten Expression und damit zur Regulation des *H-REV107-1* Gens beiträgt.

Ein besonders gut untersuchter Promoter ist der Promoter des Virus-induzierbaren IFN- β Gens. Du und Maniatis konnten innerhalb dieses Promoters eine ATF/CREB Bindungsstelle identifizieren (Du und Maniatis, 1992). Falvo *et al.* zeigten, dass zum Enhanceosom, das für die Viren-induzierte IFN- β Expression verantwortlich ist, die Proteine ATF-2/c-Jun und IRF-3 gehören. IRF-3 und ATF-2/c-Jun binden dabei gemeinsam an den Promoter. Die Orientierung der jeweiligen Bindungsstellen ist entscheidend für die Funktion des bindenden Komplexes (Falvo et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität eines Promoters auch von den Abständen und der Orientierung verschiedener Bindungsstellen zueinander abhängig ist.

Allgemeingültige Regeln für die Anordnung verschiedener Elemente zueinander sind noch nicht bekannt. So zeigt auch der Vergleich der Promotoren verschiedener, IFN- γ -abhängiger Gene hinsichtlich der Sequenz der IFN- γ abhängigen Bindungsstellen, oder der Anordnung der einzelnen Elemente zueinander, keine Gemeinsamkeiten mit dem H-REV107-1 Promoter (*Indoleamine Dioxygenase*, *PKR*, *MHC ClassII*, *SOCS-3*, *tRNA Synthetase* und *IFN- β* ; Robinson et al., 2003; Tanaka und Samuel, 1994; Giroux et al., 2003; Gatto et al., 2004; Liu et al., 2004). Für eine tiefergehende Analyse von Übereinstimmungen ist ein algorithmisches Modell von Nöten, mit Hilfe dessen gemeinsame Strukturen innerhalb verschiedener Promotoren gefunden werden können.

4.2.7 Ein Modell der *H-REV107-1* Regulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Eckpunkte der H-REV107-1 Regulation erarbeitet:

1. Die Expression von *H-REV107-1* wird durch cAMP, IFN- γ und TNF- α induziert.

2. Der Faktor IRF-1 ist für eine direkte Aktivierung der *H-rev107-1* Expression verantwortlich.
3. Ein aktiver MEK/ERK-Signalweg kann die *H-rev107-1* Expression unterdrücken.
4. Die Abwesenheit von NFκB im Zellkern senkt die H-REV107-1 Promoteraktivität.
5. Der Faktor ATF-2 bindet an das ATF-2 Element im H-REV107-1 Promoter.

Im Folgenden sollen die schon zuvor aufgeführten, Teil-Zusammenhänge in mögliches umfassendes Modell der *H-REV107-1* Regulation eingebracht werden (Abb. 60).

JNK und p38 aktivieren den, nachgewiesener Weise an den H-REV107-1 Promoter bindenden, Transkriptionsfaktor ATF-2. JNK und p38 werden ihrerseits von der IFN-γ und TNF-α induzierbaren Kinase PKR aktiviert. TNF-α induziert außerdem die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB. Dies kann über den klassischen NIK-Signalweg oder über den PKR-Signalweg geschehen.

Durch die Kinasen-vermittelte Phosphorylierung des NFκB-Suppressors IκB wird NFκB freigesetzt und wandert in den Zellkern. Dort wird seine transaktivierende Eigenschaft durch die p38-vermittelte Phosphorylierung aktiviert. IFN-γ induziert neben PKR auch die Aktivität von STAT-1. Das nach erfolgter Phosphorylierung gebildete STAT-1-Dimer wandert in den Zellkern. Hier wird die transaktivierende Eigenschaft von STAT-1 ebenfalls durch p38-vermittelte Phosphorylierung aktiviert. Der aktivierte Transkriptionsfaktor STAT-1 induziert gemeinsam mit NFκB die *IRF-1* Genexpression (gestrichelte Pfeile).

Die *IRF-1* Genexpression kann aber auch von jeweils nur einem der beiden Transkriptionsfaktoren induziert werden. IRF-1 aktiviert als Transkriptionsfaktor wiederum die p38 Genexpression (gestrichelter Pfeil).

4.2.8 Die *H-REV107-1* Expression in der Antwort der Zelle auf eine Vireninfektion

Die Behandlung von Zellen mit INF- γ induziert die *H-REV107-1* Expression. INF- γ ist ein Zytokin das in der Antwort des Körpers auf eine Vireninfektion von großer Bedeutung ist. Wird eine Virusinfektion erkannt, so produzieren und sezernieren erst T-Helfer Zellen, später auch die anderen aktivierten Zellen, INF- γ . Dieses steuert durch die Aktivierung der Oberflächenrezeptoren benachbarter Zellen die Immunantwort dieser Zellen. Auch IRF-1 und PKR, die beide durch INF- γ aktiviert werden, spielen in der Immunantwort eine wichtige Rolle. Auf Grund der gezeigten Regulation von *H-REV107-1* durch INF- γ und IRF-1 besteht die Möglichkeit, dass *H-REV107-1* in der Immunantwort der Zelle auf eine Virusinfektion von Bedeutung ist. ATF-2 ist hingegen als ein Transkriptionsfaktor beschrieben, der die virale Expression aktiviert. Adam *et al.* konnten zeigen, dass unter anderem ATF-2 für die Expression des Bovinen Leukämie Virus verantwortlich ist (Adam et al., 1996). Genauso ist ATF-2 für die virale Expression des T-Zellen Leukämie Virus Typ1 verantwortlich (Xu et al., 1996) Offenbar bedienen sich die Viren der Transkriptionsfaktoren, die im Zuge der anti-viralen Antwort aktiviert werden.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Immunantwort der Zelle auf eine Virusinfektion und der *H-REV107-1* Expression wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Christine Falk (GSF München) untersucht. Dazu wurde in primären, humanen Fibroblasten das Niveau der *H-REV107-1* Expression vor und nach einer CMV-Infektion analysiert. Tatsächlich zeigt sich nach der Infektion der Zellen eine stark erhöhte *H-REV107-1* mRNA Expression (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse, die wegen fehlender Mittel zur Zeit nicht weiter verfolgt werden können, zeigen eine weitere, interessante Möglichkeit auf, in der *H-REV107-1* von Bedeutung sein kann.

4.2.9 Die Methylierung des Promoters sowie die mögliche Bedeutung der GC-Box

Die Suppression eines Promoters durch Hypermethylierung ist ein häufig beschriebenes Ereignis. Die mögliche *in vivo* Methylierung des *H-REV107-1* Gens wird von der Arbeitsgruppe Prof. J. Walter aus Saarbrücken untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der zum Grossteil aus CpG-Inseln bestehende *H-REV107-1* Promoter in der Zelllinie OVCAR-3 methyliert ist. Dies kann ein Grund für eine Suppression der *H-REV107-1* Genexpression in dieser Zelllinie sein, wie die um 70% reduzierte Promoteraktivität des methylierten Gesamtpromoter-Konstrukts A-3 zeigt. Die Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidine zur Aufhebung einer möglichen Methylierung des Promoters führt nicht zu der Aufregulation des *H-REV107-1* Gens. Welchen Einfluss eine möglicherweise vorhandene Methylierung des *H-REV107-1* Promoters auf die endogene Genexpression hat, muss in weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Prof. Walter noch gezeigt werden.

Ausblick

In weiteren Arbeiten sollten die für die Regulation des *H-REV107-1* Gens aufgestellten Modelle überprüft werden. Dabei sind auf Besonderheiten in der Regulation von *H-REV107-1* in Mensch, Maus und Ratte zu achten.

Die Funktion des *H-REV107-1* Gens als Tumorsuppressor ist besonders im Hinblick auf seine potentielle Bedeutung in der Bekämpfung von Tumoren von Bedeutung. Daher sollte die *H-REV107-1* Regulation vor allem im humanen System weiter untersucht werden. Das Modell, dass der Kinase PKR eine zentrale Rolle in der *H-REV107-1* Regulation zuschreibt, muss noch bestätigt werden. Des weiteren können mit Western Blot Assays die Phosphorylierung verschiedener Faktoren, innerhalb der vorgeschlagenen Signalwege, in Abhängigkeit von IFN- γ , TNF- α bzw. cAMP untersucht werden. Außerdem ist die Auswirkung der Überexpression verschiedener Faktoren der Signalwege auf die *H-REV107-1* Expression von Interesse. Abgesehen von der Bedeutung von *H-REV107-1* in der Tumorsuppression sollte auch die Funktion von *H-REV107-1* in der Antwort der Zelle auf eine virale Infektion weiter untersucht werden. Auch hier spielen die Viren-induzierbare Kinase PKR, sowie IFN- γ eine zentrale Rolle.

Im Ratten Modell sollte vor allem die mögliche Suppression der *H-rev107-1* Expression durch den aktivierten MEK/ERK-Signalweg untersucht werden. Dabei könnte mit Hilfe Phospho-spezifischer Antikörper überprüft werden, ob der aktive MEK/ERK-Signalweg zu einer Hemmung der STAT-1 Aktivität führt. Dazu sollte der Phosphorylierungsstatus von STAT-1 in ROSE199, sowie in mit PD98059 behandelten Rose199A2/5 Zellen untersucht werden. Des weiteren zeigt der Ratten Promoter eine Region mit mehreren NF κ B-Bindungsstellen, die im Promoter der Maus und des Menschen nicht vorkommt. Daher sollte auch eine mögliche Regulation des Ratten *H-rev107-1* Gens in Abhängigkeit von TNF- α bzw. NF κ B untersucht werden.

Im Maus Modell sollte die gezeigte IRF-1 Abhängigkeit der *H-rev107-1* Expression weiter untersucht werden. Dafür spricht auch das gehäufte Vorkommen von IRF-Bindungsstellen im Maus Promoter. Ein direktes Ergebnis würde die Untersuchung von IRF-1 defizienten NIH3T3 Zellen auf die Expression von *H-rev107-1* bringen.

Falls es gelingt, einen größeren Bereich des humanen *H-REV107-1* Promoters zu klonieren, sollte zumindest noch die zweite, 5' der in dieser Arbeit verwendeten Promoterregion liegende, IRF-1 Bindungsstelle untersucht werden. Um die Schwächen der transienten Transfektion zu umgehen, sollten auch die Methoden der stabilen Transfektion und des CHIP-Assays zur Anwendung kommen. Dabei sollte auch die Wechselwirkung zwischen ATF-2 und dem RNA PolymeraseII Komplex *in vivo* untersucht werden, da es sich, bei einem positiven Nachweis, beim *H-REV107-1* Promoter um den ersten endogenen Promoter handelt, für den der Ersatz der TATA-Box durch ATF-2 *in vivo* nachgewiesen wäre. Auch weitere Elemente des Core-Promoters sollten auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Von besonderem Interesse ist dabei vor allem das, in direkter Nachbarschaft zur ATF-2 Bindungsstelle doppelt vorkommende, BRE-Element.

Referenzen

- Adam, E., Kerkhofs, P., Mammerickx, M., Burny, A., Kettman, R., Willems, L., The CREB, ATF-1, and ATF-2 transcription factors from bovine leukemia virus-infected B lymphocytes activate viral expression., *J Virol.*, 1996, (70), 1990-1999.
- Adam, P.J., Boyd, R., Tyson, K.L., Fletcher, G.C., Stamps, A., Hudson, L., Poyser, H.R., Redpath, N., Griffiths, M., Steers, G., Harris, A.L., Patel, S., Berry, J., Loader, J.A., Townsend, R.R., Daviet, L., Legrain, P., Parekh, R., Terrett, J.A., Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer., *J Biol. Chem.*, 2003, (278), 6482-6489.
- Adams, A.T. und Auersperg, N., A cell line, ROSE 199, derived from normal rat ovarian surface epithelium., *Exp. Cell Biol.*, 1985, (53), 181-188.
- Akiyama, H., Hiraki, Y., Noda, M., Shigeno, C., Ito, H., Nakamura, T., Molecular cloning and biological activity of a novel Ha-Ras suppressor gene predominantly expressed in skeletal muscle, heart, brain, and bone marrow by differential display using clonal mouse EC cells, ATDC5., *J. Biol. Chem.*, 1999, (274), 32192-32197.
- Alsayed, Y., Uddin, S., Ahmad, S., Majchrzak, B., Druker, B.J., Fish, E.N., Platanias, L.C., IFN-gamma activates the C3G/Rap1 signaling pathway., *J Immunol.*, 2000, (164), 1800-1806.
- Anantharaman, V. und Aravind, L., Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes., *Genome Biol.*, 2003, (4).
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D., NF-kappa B: ten years after., *Cell.*, 1996, (87), 13-20.
- Baker, K.M., Wei, G., Schaffner, A.E., Ostrowski, M.C., Ets-2 and components of mammalian SWI/SNF form a repressor complex that negatively regulates the BRCA1 promoter., *J Biol. Chem.*, 2003, (278), 17876-17884.
- Barber, G.N., The interferons and cell death: guardians of the cell or accomplices of apoptosis?, *Semin. Cancer Biol.*, 2000, (10), 103-111.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D., Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B., *Nature.*, 1995, (376), 167-170.
- Bluyssen, H.A. und Levy, D.E., Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA., *J Biol. Chem.*, 1997, (272), 4600-4605.
- Bokar, J.A., Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., Kaetzel, D.M., Hanson, R.W., Nilson, J.H., Characterization of the cAMP responsive elements from the genes for the alpha-subunit of glycoprotein hormones and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Conserved features of nuclear protein binding between tissues and species., *J Biol. Chem.*, 1988, (263), 19740-19747.

- Bonello, M.R. und Khachigian, L.M., Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR- α) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR- α promoter., *J Biol. Chem.*, 2004, (279), 2377-2382.
- Bottrel, R.L.A., Yang, Y., Levy, D.L., Tomai, M., Reis, L.F.L., The Immune Response Modifier Imiquimod Requires STAT-1 for induction of Interferon, Interferon-Stimulated Genes, and Interleukin-6., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, (43), 856-861
- Bos, J.L., ras oncogenes in human cancer: a review., *Cancer Res.*, 1989, (49), 4682-4689.
- Burke, T.W. und Kadonaga, J.T., The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*., *Genes Dev.*, 1997, (11), 3020-3031.
- Butler, J.E. und Kadonaga, J.T., The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression., *Genes Dev.*, 2002, (16), 2583-2592.
- Chalkley, G.E. und Verrijzer, C.P., DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator., *EMBO J.*, 1999, (18), 4835-4845.
- Chen, B., He, L., Savell, V.H., Jenkins, J.J., Parham, D.M., Inhibition of the interferon- γ /signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region., *Cancer Res.*, 2000, (60), 3290-3298.
- Coccia, E.M., Del Russo, N., Stellacci, E., Orsatti, R., Benedetti, E., Marziali, G., Hiscott, J., Battistini, A., Activation and repression of the 2-5A synthetase and p21 gene promoters by IRF-1 and IRF-2., *Oncogene.*, 1999, (18), 2129-2137.
- Conaway, J.W. und Conaway, R.C., Initiation of eukaryotic messenger RNA synthesis., *J Biol. Chem.*, 1991, (266), 17721-17724.
- Dale, T.C., Rosen, J.M., Guille, M.J., Lewin, A.R., Porter, A.G., Kerr, I.M., Stark, G.R., Overlapping sites for constitutive and induced DNA binding factors involved in interferon-stimulated transcription., *EMBO J.*, 1989, (8), 831-839.
- de Martin, R., Schmid, J.A., Hofer-Warbinek, R., The NF- κ B/Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis., *Mutat. Res.*, 1999, (437), 231-243.
- De Saint, J.M., Debbasch, C., Rahmani, M., Brignole, F., Feldmann, G., Warnet, J.M., Baudouin, C., Fas- and interferon gamma-induced apoptosis in Chang conjunctival cells: further investigations., *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, (41), 2531-2543.
- Della Fazia, M.A., Servillo, G., Sassone-Corsi, P., Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM., *FEBS Lett.*, 1997, (410), 22-24.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H., Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, (95), 15623-15628.

- Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo, C.F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S., Pelicci, P.G., Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor., *Science.*, 2002, (295), 1079-1082.
- DiSepio, D., Ghosn, C., Eckert, R.L., Deucher, A., Robinson, N., Duvic, M., Chandraratna, R.A., Nagpal, S., Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, (95), 14811-14815.
- Drew, P.D., Franzoso, G., Becker, K.G., Bours, V., Carlson, L.M., Siebenlist, U., Ozato, K., NF kappa B and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression., *J Interferon Cytokine Res.*, 1995, (15), 1037-1045.
- Du, W. und Maniatis, T., An ATF/CREB binding site is required for virus induction of the human interferon beta gene [corrected]., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992, (89), 2150-2154.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression., *Cell.*, 1993, (75), 817-825.
- Esteller, M., Cordon-Cardo, C., Corn, P.G., Meltzer, S.J., Pohar, K.S., Watkins, D.N., Capella, G., Peinado, M.A., Matias-Guiu, X., Prat, J., Baylin, S.B., Herman, J.G., p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2., *Cancer Res.*, 2001, (61), 2816-2821.
- Esteller, M., Fraga, M.F., Paz, M.F., Campo, E., Colomer, D., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Galm, O., Guo, M., Benitez, J., Herman, J.G., Cancer epigenetics and methylation., *Science.*, 2002, (297), 1807-1808.
- Evans, R., Fairley, J.A., Roberts, S.G., Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB., *Genes Dev.*, 2001, (15), 2945-2949.
- Falvo, J.V., Parekh, B.S., Lin, C.H., Fraenkel, E., Maniatis, T., Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation., *Mol. Cell Biol.*, 2000, (20), 4814-4825.
- Franek, W.R., Horowitz, S., Stansberry, L., Kazzaz, J.A., Koo, H.C., Li, Y., Arita, Y., Davis, J.M., Mantell, A.S., Scott, W., Mantell, L.L., Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells., *J Biol. Chem.*, 2001, (276), 569-575.
- Fukushima, A., Okuda, A., Nishimoto, M., Seki, N., Hori, T.A., Muramatsu, M., Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity., *J Biol. Chem.*, 1998, (273), 25840-25849.
- Gabriel, H.D., Strobl, B., Hellmann, P., Buettner, R., Winterhager, E., Organization and regulation of the rat Cx31 gene. Implication for a crucial role of the intron region., *Eur. J Biochem.*, 2001, (268), 1749-1759.
- Gatto, L., Berlato, C., Poli, V., Tininini, S., Kinjyo, I., Yoshimura, A., Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma., *J Biol. Chem.*, 2004, (279), 13746-13754.

- Giroux, M., Schmidt, M., Descoteaux, A., IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C- α ., *J Immunol.*, 2003, (171), 4187-4194.
- Hai, T. und Curran, T., Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, (88), 3720-3724.
- Hai, T.W., Liu, F., Coukos, W.J., Green, M.R., Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers., *Genes Dev.*, 1989, (3), 2083-2090.
- Hajnal, A., Klemen, R., Schafer, R., Up-regulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras-transformed rat fibroblasts., *Cancer Res.*, 1993, (53), 4670-4675.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer., *Cell.*, 2000, (100), 57-70.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., Taniguchi, T., Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes., *Cell.*, 1989, (58), 729-739.
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., Taniguchi, T., Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2., *Science.*, 1993, (259), 971-974.
- Harada, H., Kondo, T., Ogawa, S., Tamura, T., Kitagawa, M., Tanaka, N., Lamphier, M.S., Hirai, H., Taniguchi, T., Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; A possible mechanism of tumor suppressor inactivation., *Oncogene.*, 1994, (9), 3313-3320.
- Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.P., Davidson, N.E., Sidransky, D., Baylin, S.B., Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers., *Cancer Res.*, 1995, (55), 4525-4530.
- Hughes, P.J. und Stanway, G., The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation., *J. Gen. Virol.*, 2000, (81), 201-207.
- Husmann, K., Sers, C., Fietze, E., Mincheva, A., Lichter, P., Schäfer, R., Transcriptional and translational downregulation of H-REV107, a class II tumour suppressor gene located on human chromosome 11q11-12., *Oncogene.*, 1998, (17), 1305-1312.
- Ihle, J.N. und Kerr, I.M., Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily., *Trends Genet.*, 1995, (11), 69-74.
- Ince, T.A. und Scotto, K.W., A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters., *J Biol. Chem.*, 1995, (270), 30249-30252.

- Issa, J.P., Garcia-Manero, G., Giles, F., Mannari, R., Thomas, D., Faderl, S., Bayar, E., Lyons, J., Rosenfeld, C., Cortes, J., Kantarjian, H., Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies., *Blood*, 2004, (103), 1635-1640.
- Ito, H., Akiyama, H., Shigeno, C., Nakamura, T., Isolation, characterization, and chromosome mapping of a human A-C1 Ha-Ras suppressor gene (HRASLS)., *Cytogenet Cell Genet.*, 2001, (93), 36-39.
- Joyce, G.F., Directed molecular evolution., *Sci. Am.*, 1992, (267), 90-97.
- Jung, D., Jaeger, E., Cayeux, S., Blankenstein, T., Hilmes, C., Karbach, J., Moebius, U., Knuth, A., Huber, C., Seliger, B., Strong immunogenic potential of a B7 retroviral expression vector: generation of HLA-B7-restricted CTL response against selectable marker genes., *Hum. Gene Ther.*, 1998, (9), 53-62.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., Schreiber, R.D., Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, (95), 7556-7561.
- Kirchhoff, S. und Hauser, H., Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF- 1 results in apoptosis., *Oncogene*, 1999, (18), 3725-3736.
- Klampfer, L., Huang, J., Corner, G., Mariadason, J., Arango, D., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Augenlicht, L., Oncogenic k-ras inhibits the expression of IFN-responsive genes through inhibition of STAT1 and STAT2 expression., *J. Biol. Chem.*, 2003.
- Kontgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., Gerondakis, S., Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression., *Genes Dev.*, 1995, (9), 1965-1977.
- Kroger, A., Dallugge, A., Kirchhoff, S., Hauser, H., IRF-1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro and in vivo., *Oncogene*, 2003, (22), 1045-1056.
- Kuchinke, W., Hart, R.P., Jonakait, G.M., Identification of mRNAs regulated by interferon-gamma in cultured rat astrocytes by PCR differential display., *Neuroimmunomodulation*, 1995, (2), 347-355.
- Kuivaniemi, H., Partial characterization of lysyl oxidase from several human tissues., *Biochem. J.*, 1985, (230), 639-643.
- Kumar, A., Yang, Y.L., Flati, V., Der, S., Kadereit, S., Deb, A., Haque, J., Reis, L., Weissmann, C., Williams, B.R., Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB., *EMBO J.*, 1997, (16), 406-416.
- Kurzrock, R., Gutterman, J.U., Talpaz, M., The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias., *N. Engl. J Med.*, 1988, (319), 990-998.
- Kutach, A.K. und Kadonaga, J.T., The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters., *Mol. Cell Biol.*, 2000, (20), 4754-4764.

- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., Ebright, R.H., New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB., *Genes Dev.*, 1998, (12), 34-44.
- Lalli, E. und Sassone-Corsi, P., Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP., *J Biol. Chem.*, 1994, (269), 17359-17362.
- Larsen, N.I., Engelbrecht, J., Brunak, S., Analysis of eukaryotic promoter sequences reveals a systematically occurring CT-signal., *Nucleic Acids Res.*, 1995, (23), 1223-1230.
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R., Role for DNA methylation in genomic imprinting., *Nature.*, 1993, (366), 362-365.
- Li, X.Y. und Green, M.R., Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain., *Genes Dev.*, 1996, (10), 517-527.
- Liu, J., Shue, E., Ewalt, K.L., Schimmel, P., A new gamma-interferon-inducible promoter and splice variants of an anti-angiogenic human tRNA synthetase., *Nucleic Acids Res.*, 2004, (32), 719-727.
- Lotz, K. und Sers, C., Manuskript eingereicht
- Malik, S.T., Knowles, R.G., East, N., Lando, D., Stamp, G., Balkwill, F.R., Antitumor activity of gamma-interferon in ascitic and solid tumor models of human ovarian cancer., *Cancer Res.*, 1991, (51), 6643-6649.
- Mashimo, T., Watabe, M., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Tegtmeyer, P.J., Rinker-Shaeffer, C.W., Watabe, K., The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, (95), 11307-11311.
- Mecucci, C., Ghione, F., Tricot, G., van den, B.H., Combined trisomy 1q and monosomy 7q due to translocation 1;7 in myelodysplastic syndromes., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1985, (18), 193-197.
- Mori, K., Stone, S., Khaodhiar, L., Braverman, L.E., DeVito, W.J., Induction of transcription factor interferon regulatory factor-1 by interferon-gamma (IFN gamma) and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in FRTL-5 cells., *J Cell Biochem.*, 1999, (74), 211-219.
- Muller, F.U., Neumann, J., Schmitz, W., Transcriptional regulation by cAMP in the heart., *Mol. Cell Biochem.*, 2000, (212), 11-17.
- Nazarenko I., Sers C., submitted, 2004
- Ng, M.H., Chung, Y.F., Lo, K.W., Wickham, N.W., Lee, J.C., Huang, D.P., Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma., *Blood.*, 1997, (89), 2500-2506.
- Nguyen, H., Ramana, C.V., Bayes, J., Stark, G.R., Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression., *J Biol. Chem.*, 2001, (276), 33361-33368.

- Norris, J.L. und Baldwin, A.S., Jr., Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways., *J Biol. Chem.*, 1999, (274), 13841-13846.
- Nozawa, H., Oda, E., Ueda, S., Tamura, G., Maesawa, C., Muto, T., Taniguchi, T., Tanaka, N., Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer., *Int. J. Cancer.*, 1998, (77), 522-527.
- Oberhuber, H., Seliger, B., Schafer, R., Partial restoration of pre-transformation levels of lysyl oxidase and transin mRNAs in phenotypic ras revertants., *Mol. Carcinog.*, 1995, (12), 198-204.
- Ohmori, Y., Schreiber, R.D., Hamilton, T.A., Synergy between Interferon-g and Tumor Necrosis Factor-a in Transcriptional Activation Is Mediated by Cooperation between Signal Transducer and Activator of Transcription 1 and Nuclear Factor kB, *J. Biol. Chem.*, (272), 14899-14907
- Pine, R., Decker, T., Kessler, D.S., Levy, D.E., Darnell, J.E., Jr., Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either., *Mol. Cell Biol.*, 1990, (10), 2448-2457.
- Pine, R., Convergence of TNFalpha and IFNgamma signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kappaB promoter element., *Nucleic Acids Res.*, 1997, (25), 4346-4354.
- Piskurich, J.F., Wang, Y., Linhoff, M.W., White, L.C., Ting, J.P., Identification of distinct regions of 5' flanking DNA that mediate constitutive, IFN-gamma, STAT1, and TGF-beta-regulated expression of the class II transactivator gene., *J Immunol.*, 1998, (160), 233-240.
- Prives, C., Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit., *Cell.*, 1998, (95), 5-8.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D., Stark, G.R., Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling., *Trends in Immunology*, 2002, (23), 96-101.
- Rando, R.R., Membrane-bound lecithin-retinol acyltransferase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, (292), 1243-1250.
- Reik, W. und Walter, J., Genomic imprinting: parental influence on the genome., *Nat Rev Genet.*, 2001, (2), 21-32.
- Robinson, C.M., Shirey, K.A., Carlin, J.M., Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha., *J Interferon Cytokine Res.*, 2003, (23), 413-421.
- Roder, K., Latasa, M.J., Sul, H.S., Murine H-rev107 gene encoding a class II tumor suppressor: gene organization and identification of an Sp1/Sp3-binding GC-box required for its transcription., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, (293), 793-799.
- Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., Hanson, R.W., Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription., *J Biol. Chem.*, 1988, (263), 9063-9066.

- Rudge, T.L. und Johnson, L.F., Inactivation of MED-1 elements in the TATA-less, initiator-less mouse thymidylate synthase promoter has no effect on promoter strength or the complex pattern of transcriptional start sites., *J Cell Biochem.*, 1999, (73), 90-96.
- Saito, T., Berens, M.E., Welander, C.E., Direct and indirect effects of human recombinant gamma-interferon on tumor cells in a clonogenic assay., *Cancer Res.*, 1986, (46), 1142-1147.
- Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., Sidransky, D., Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung., *Cancer Res.*, 2002, (62), 3659-3662.
- Sen, R. und Baltimore, D., Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences., *Cell.*, 1986, (46), 705-716.
- Sers, C., Emenegger, U., Husmann, K., Bucher, K., Andres, A.-C., Schäfer, R., Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors., *J. Cell. Biol.*, 1997, (136), 935-944.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., Gray, J.W., PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer., *Nat Genet.*, 1999, (21), 99-102.
- Sherr, C.J. und Roberts, J.M., CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression., *Genes Dev.*, 1999, (13), 1501-1512.
- Singer, V.L., Wobbe, C.R., Struhl, K., A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation., *Genes Dev.*, 1990, (4), 636-645.
- Smale, S.T., Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation., *Genes Dev.*, 2001, (15), 2503-2508.
- Stevaux, O. und Dyson, N.J., A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, (14), 684-691.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J., Marra, M.A., Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, (99), 16899-16903.

- Sun, Y., Deng, D., You, W.C., Bai, H., Zhang, L., Zhou, J., Shen, L., Ma, J.L., Xie, Y.Q., Li, J.Y., Methylation of p16 CpG islands associated with malignant transformation of gastric dysplasia in a population-based study., *Clin. Cancer Res.*, 2004, (10), 5087-5093.
- Suzuki, Y., Yamashita, R., Nakai, K., Sugano, S., DBTSS: DataBase of human Transcriptional Start Sites and full-length cDNAs., *Nucleic Acids Res.*, 2002, (30), 328-331.
- Suzuki, Y. und Sugano, S., Construction of a full-length enriched and a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method., *Methods Mol. Biol.*, 2003, (221), 73-91.
- Szyf, M., DNA methylation and cancer therapy., *Drug Resist. Updat.*, 2003, (6), 341-353.
- Takahira, T., Oda, Y., Tamiya, S., Yamamoto, H., Kawaguchi, K., Kobayashi, C., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., Alterations of the p16INK4a/p14ARF pathway in clear cell sarcoma., *Cancer Sci.*, 2004, (95), 651-655.
- Takaoka, A., Tanaka, N., Mitani, Y., Miyazaki, T., Fujii, H., Sato, M., Kovarik, P., Decker, T., Schlessinger, J., Taniguchi, T., Protein tyrosine kinase Pyk2 mediates the Jak-dependent activation of MAPK and Stat1 in IFN-gamma, but not IFN-alpha, signaling., *EMBO J.*, 1999, (18), 2480-2488.
- Takaoka, A.S., Yamada, T., Gotoh, M., Kanai, Y., Imai, K., Hirohashi, S., Cloning and characterization of the human beta4-integrin gene promoter and enhancers., *J Biol. Chem.*, 1998, (273), 33848-33855.
- Tamura, G., Ogasawara, S., Nishizuka, S., Sakata, K., Maesawa, C., Suzuki, Y., Terashima, M., Saito, K., Satodate, R., Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach., *Cancer Res.*, 1996, (56), 612-615.
- Tanaka, H. und Samuel, C.E., Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, (91), 7995-7999.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Taniguchi, T., Suppression of c-myc or fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1., *Cancer Lett.*, 1994, (83), 191-196.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.S., Aizawa, S., Mak, T.W., Taniguchi, T., Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1., *Cell.*, 1994, (77), 829-839.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T.W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., Taniguchi, T., Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage., *Nature.*, 1996, (382), 816-818.
- Tanaka, N. und Taniguchi, T., The interferon regulatory factors and oncogenesis., *Semin. Cancer Biol.*, 2004, (10), 73-81.
- Tate, P.H. und Bird, A.P., Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1993, (3), 226-231.

- Tchernitsa, O.I., Sers, C., Zuber, J., Hinemann, B., Grips, M., Schwendel, A., Rosenthal, A., Schäfer, R., The transcriptional basis of KRAS-oncogene-mediated transformation in ovarian epithelial cells., *Oncogene.*, 2004, (in press),
- Tiainen, M., Ylikorkala, A., Makela, T.P., Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, (96), 9248-9251.
- Todaro, G. und Green, H., Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines., *J. Cell Biol.*, 1963, (17), 299-313.
- Trink, B., Pai, S.I., Spunt, S.L., Raman, V., Cairns, P., Jen, J., Gabrielson, E., Sukumar, S., Sidransky, D., Absence of TSG101 transcript abnormalities in human cancers., *Oncogene.*, 1998, (16), 2815-2818.
- Tsao, S.-W., Mok, S.C., Fey, E.G., Fletcher, J.A., Wan, T.S.K., Chew, E.-C., Muto, M.G., Knapp, R.C., Berkowitz, R.S., Characterization of human ovarian epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs)., *Exp. Cell Res.*, 1995, (218), 499-507.
- Tuveson, D.A. und Jacks, T., Modeling human lung cancer in mice: similarities and shortcomings., *Oncogene.*, 1999, (18), 5318-5324.
- Uddin, S., Sher, D.A., Alsayed, Y., Pons, S., Colamonici, O.R., Fish, E.N., White, M.F., Platanias, L.C., Interaction of p59fyn with interferon-activated Jak kinases., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, (235), 83-88.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F., A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)., *J. Biol. Chem.*, 1994, (269), 5241-5248.
- von Lintig, F.C., Dreilinger, A.D., Varki, N.M., Wallace, A.M., Casteel, D.E., Boss, G.R., Ras activation in human breast cancer., *Breast Cancer Res. Treat.*, 2000, (62), 51-62.
- Wang, T., Lafuse, W.P., Zwilling, B.S., NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by Mycobacterium avium., *J Immunol.*, 2001, (167), 6924-6932.
- Ward, A.C., Hermans, M.H., Smith, L., van Aesch, Y.M., Schelen, A.M., Antonissen, C., Touw, I.P., Tyrosine-dependent and -independent mechanisms of STAT3 activation by the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor are differentially utilized depending on G-CSF concentration., *Blood.*, 1999, (93), 113-124.
- Waters, S.B., Holt, K.H., Ross, S.E., Syu, L.-J., Guan, K.-L., Saltiel, A.R., Koretzky, G.A., Pessin, J.E., Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex., *J. Biol. Chem.*, 1995, (270), 20883-20886.
- Watnick, R.S., Cheng, Y.N., Rangarajan, A., Ince, T.A., Weinberg, R.A., Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis., *Cancer Cell.*, 2003, (3), 219-231.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.P., Lira, S.A., Bravo, R., Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family., *Cell.*, 1995, (80), 331-340.

- Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control., *Cell.*, 1995, (81), 323-330.
- Willman, C.L., Sever, C.E., Pallavicini, M.G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M.L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T.C., List, A.F., Taniguchi, T., Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preneoplastic myelodysplasia., *Science.*, 1993, (259), 968-970.
- Windbichler, G.H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., Graf, A.H., Kainz, C., Lahodny, J., Denison, U., Muller-Holzner, E., Marth, C., Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial., *Br. J Cancer.*, 2000, (82), 1138-1144.
- Xu, X., Kang, S.H., Heidenreich, O., Brown, D.A., Nerenberg, M.I., Sequence requirements of ATF2 and CREB binding to the human T-cell leukemia virus type 1 LTR R region., *Virology.*, 1996, (218), 362-371.
- Yang, B., Guo, M., Herman, J.G., Clark, D.P., Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma., *Am. J Pathol.*, 2003, (163), 1101-1107.
- Zeuthen, J., Norgaard, J.O., Avner, P., Fellous, M., Wartiovaara, J., Vaheri, A., Rosen, A., Giovanella, B.C., Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line., *Int J Cancer.*, 1980, (25), 19-32.
- Zhang, B., Liu, S., Perpetua, M.D., Walker, W.H., Harbrecht, B.G., Cytokines increase CRE binding but decrease CRE-mediated reporter activity in rat hepatocytes by increasing c-Jun., *Hepatology.*, 2004, (39), 1343-1352.
- Zhang, Y. und Xiong, Y., Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53., *Mol. Cell.*, 1999, (3), 579-591.
- Zhou, D.C., Simonin, G., Faussat, A.M., Zittoun, R., Marie, J.P., Effect of the multidrug inhibitor GG918 on drug sensitivity of human leukemic cells., *Leukemia.*, 1997, (11), 1516-1522.
- Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M.J., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E., Sager, R., Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells., *Science.*, 1994, (263), 526-529.
- Zou, Z., Gao, C., Nagaich, A.K., Connell, T., Saito, S., Moul, J.W., Seth, P., Appella, E., Srivastava, S., p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin., *J Biol. Chem.*, 2000, (275), 6051-6054.

Danksagung

Ich möchte mich bei all den Menschen bedanken, die mir bei der Durchführung dieser Doktorarbeit tatkräftig geholfen haben.

Besonders hervorheben möchte ich:

Frau Dr. Sers, die mich innerhalb dieser Zeit von den ersten Kapiteln des "Knippers" bis zur letzten Korrektur dieser Arbeit unterstützt und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ich danke ihnen für ihr Vertrauen in meine Person, ihre Geduld und ihre Mühe, einem Chemiker das Wissen der Molekularbiologie zu vermitteln.

Herrn Prof. Schäfer, der mir durch die sachliche Analyse meiner Ergebnisse manche Lücke in meiner Beweisführung zeigen konnte. Darüber hinaus danke ich ihnen dafür, dass sie mir die Bedeutung des engagierten Vorstellens eigener Ergebnisse sowie der aktiven Beteiligung an Diskussionen nahe bringen konnten.

Herrn Prof. Herzel, für die sehr interessanten Diskussionen über gewonnene Daten aus der Sicht der Theoretischen Biologie. Die Erfahrung, eine Problemstellung von zwei so unterschiedlichen Blickwinkeln betrachten und analysieren zu können, ist für mich eine wichtige Bereicherung über diese Arbeit hinaus. Außerdem bedanke ich mich für die offizielle Betreuung dieser Promotion und habe mich auch über ihre Anwesenheit an der Alten Försterei gefreut. UNVEU!

Meine netten Kolleginnen und Kollegen in unserer Arbeitsgruppe, die mir mit Rat und Tat und guter Laune zur Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Conny Gieseler und Frau Jana Keil.

Publikationsliste

1. Reich S, Sers C, "The class II tumor suppressor gene *H-REV107-1* is positively regulated by the transcription factor ATF-2", (Manuskript in Bearbeitung)
2. Nazarenko I, Reich S, Sers C, "The HRS-like superfamily: Novel mediators of differentiation and control of cellular survival", *Oncogene*, (Manuskript übermittelt)
3. Sers C, Husmann K, Nazarenko I, Reich S, Wiechen K, Zhumabayeva B, Adhikari P, Schröder K, Gontarewicz A, Schäfer R., "The class II tumour suppressor gene *H-REV107-1* is a target of interferon-regulatory factor-1 and is involved in IFN γ -induced cell death in human ovarian carcinoma cells", *Oncogene*, 2002; 21 (18):2829-39
4. Posterpräsentation auf der Klausurtagung des Graduiertenkollegs 2002, Wandlitz
"The Class II Tumor Suppressor Gene *H-REV107-1* is a Target of NFkappaB". Steffen Reich, Reinhold Schäfer, Christine Sers
5. Posterpräsentation auf dem „Signal Transduction Meeting 2002“, Luxemburg
"The Class II Tumor Suppressor Gene *H-REV107-1* is a Target of Interferon-Regulatory Factor-1". Steffen Reich, Irina Nazarenko, Katharina Schröder, Reinhold Schäfer, Christine Sers
6. Posterpräsentation auf dem „92th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research“ in New Orleans, USA
"The class II tumour suppressor gene *H-REV107-1* is a target of interferon regulatory factor-1 (IRF-1)". Steffen Reich, Irina Nazarenko, Reinhold Schaefer, Barabara Seliger, Christine Sers

Berlin, den 10. Juni 2005

Steffen Reich

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 10. Juni 2005

Steffen Reich